

**Isolation, Ultrastruktur und
stoffwechselphysiologische Aktivitäten von
Protoplasten aus dem Mesophyll
von *Vitis vinifera***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
der
UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
MARLIES HASLER
von Hasle/Burgdorf BE

Begutachtet von Frau Prof. Dr. D.M. Rast

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1983

**Isolation, Ultrastruktur und
stoffwechselphysiologische Aktivitäten von
Protoplasten aus dem Mesophyll
von *Vitis vinifera***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
der
UNIVERSITÄT ZÜRICH

von
MARLIES HASLER
von Hasle/Burgdorf BE

Begutachtet von Frau Prof. Dr. D.M. Rast

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I.	Einleitung	5
II.	Material und Methoden	9
	1. Pflanzenmaterial	9
	2. Isolation und Reinigung der Protoplasten	9
	3. Histochemische Tests	11
	4. Elektronenmikroskopie	12
	5. Enzymatische Bestimmung der Aepfelsäure	13
	6. Quantitierung von Chlorophyll	14
	7. Extraktzubereitung	14
	8. Chromatographische Methoden	15
	9. Tracerversuche	16
	10. Herkunft spezieller Chemikalien	17
III.	Resultate	18
	1. Isolation von Protoplasten	18
	1.1. Einfluss von Blattalter und Kultivationsbedingungen auf die Ausbeute an Protoplasten	19
	1.2. Zellphysiologische Merkmale von Rebenprotoplasten	20
	1.3. Vitalitätstests	21
	2. Vergleich der Ultrastruktur von Protoplasten und Mesophyllzellen von Rebenblättern	21
	3. Vergleich der Fraktion der nichtflüchtigen, organischen Säuren mit derjenigen von Blattgewebe	30
	3.1. Qualitative Zusammensetzung der Säurefraktion	30
	3.2. Aepfelsäurekonzentration	32
	4. Beeinflussung stoffwechselphysiologischer Aktivitäten der Protoplasten durch exogene Faktoren	34
	4.1. Aepfelsäuremetabolismus	34
	4.2. CO ₂ -Fixierung	42
IV.	Diskussion	47
V.	Zusammenfassung	54
VI.	Literaturverzeichnis	56

I. EINLEITUNG

Die klassische Bezeichnung "Protoplast" umfasst definitionsgemäss die Gesamtheit der lebenden Zellbestandteile, ungeachtet dessen, ob sie von einer Zellwand umgeben sind oder nicht. Es hat sich in neuerer Zeit nun allerdings eingebürgert, den Ausdruck fast ausschliesslich auf nackte, nach künstlicher Entfernung der Wand erhaltene, lebende Zellen anzuwenden (Frey-Wyssling, 1967). Der Terminus wird im folgenden in diesem einschränkenden Sinn verwendet.

Grundsätzlich kennt man zwei Methoden zur Isolation von Protoplasten: ein sog. mechanisches Verfahren, bei welchem das Zerschneiden plasmolysierten Gewebes Protoplasten liefert (Klercker, 1892) und eine enzymatische Technik, die in der Entfernung der Wand durch entsprechende lytische Enzyme besteht (Cocking, 1960). Die erstere Methode ergibt jedoch nur geringe Ausbeuten und so kaum genügend Material für umfassendere Untersuchungen.

Zur Herstellung von Protoplasten aus Zellen grüner Pflanzen bietet sich der chemischen Zusammensetzung der Matrix und der Fibrillärkomponente der Wand sowie der kommerziellen Verfügbarkeit der erforderlichen Enzyme entsprechend also vorwiegend die Verwendung von Cellulase und Pektinase an. Die handelsüblichen, partiell gereinigten Cellulasen sind jedoch meist Mischungen von Enzymen, die neben β -1,4-Glucosidase-Aktivität auch lytische Wirkung auf mehrere weitere Polysaccharide, insbesondere auch auf Polygalacturonsäuren, zeigen. Aus pflanzlichem Gewebe lassen sich Protoplasten einerseits sequentiell, d.h. nach Auflösung des Zellverbandes durch Pektinase in Einzelzellen, oder aber durch Anwendung eines dieser Cellulasepräparate direkt isolieren (Cocking, 1972; Vasil, 1976; Bajaj, 1977). Art und Konzentration der zur optimalen Ausbeute an Protoplasten benötigten Enzympräparationen sind vom Gewebetyp abhängig. In den letzten Jahren ist das beschriebene Verfahren zur Gewinnung von Protoplasten aus praktisch allen Organen, Geweben und Typen von Einzelzellen angewendet worden, so zur Isolation von Protoplasten aus der Wurzel und aus Wurzelknöllchen (Cocking, 1962; Wooi und Broughton, 1979; Davey et al., 1980; Kajita et al., 1980; Senn und Pilet, 1980), dem Stengel (Williamson, 1979), dem Blatt (sehr zahlreiche Arbeiten, für eine Liste s. Bajaj, 1977), aus der Frucht (Cocking und Pojnar, 1969; Mishra und Colvin, 1969; Willison und Cocking, 1972; Coombe und Matile, pers. Mitt.), aus Kallussen (Schenk und Hildebrandt, 1969; Horine und Ruesink, 1972; Robenek und Peveling, 1975 und 1977; Gigot et al., 1972) und Zellsuspensionskulturen (Grambow et al., 1972; Ohyama et al., 1972; Williamson et al., 1977; Boss und Ruesink,

1977) sowie aus Pollenkörnern (Bajaj und Davey, 1974). Durch technische Verfeinerung bei der zur Reinigung der Protoplasten angewendeten Stufengradientenzentrifugation ist es schliesslich auch gelungen, Schliesszellen (Schnabl et al., 1978; Schnabl, 1980 und 1981) und Leitbündelscheidenzellen aus C_4 -Pflanzen (Kanai und Edwards, 1973a; Gutierrez et al., 1974; Ku et al., 1974) im Isolat anzureichern. Trotz dieser zahlreichen Beispiele erfolgreicher Protoplastenisolationen lässt sich das enzymatische Standardverfahren nicht generell problemlos anwenden; denn spezies- und umweltbedingte Variationen in der chemischen Zusammensetzung der Zelle, insbesondere der Wand, können starke Unterschiede in der Suszeptibilität gegenüber lytischen Enzymen bewirken. Auch treten bei hohem Gehalt an Phenolen Hemmwirkungen auf die Aktivität von Enzymen (van Sumere et al., 1975) und somit auch der Cellulase auf. So konnten z.B. bei der Weinrebe Protoplasten bisher nur aus Suspensionskulturen (Burgess und Linstead, 1976 a und b), Kallusgewebe (Skene, 1974 und 1975) und Traubenbeeren (Brown, 1981; Coombe und Matile, pers. Mitt.; Hasler, 1978) gewonnen werden, und bei entsprechender Behandlung von Blättern ergab sich nur eine Auflösung in Einzelzellen, nicht aber ein Abbau der Wand (Skene, 1977).

Bei Gewinnung von Protoplasten mittels des enzymatischen Verfahrens bleibt stets die Frage offen, wie weit diese durch die Einwirkung ungereinigter – und somit chemisch ungenügend definierter – Enzymgemische (Hall und Wood, 1970; Schenk und Hildebrandt, 1969), durch Zusätze von Antibiotika gegen Bakterienbefall (Robinson und Schlösser, 1978) und durch die plasmolysierende Wirkung des Isolationsmediums (Prat, 1972) alteriert werden. Solche Beeinträchtigungen können sich auf struktureller Ebene – in Form von Schädigungen der Plasmamembran und Veränderungen der Organellen (Gigot et al., 1972 und 1975; Taylor und Hall, 1978) – oder auf funktioneller Stufe – durch Beeinflussung der Stoffwechselaktivität, z.B. durch Hemmung der Photosynthese (Morris et al., 1981) und in Störungen des Kurzstreckentransports (Ruesink, 1978) – äussern. Dieser allenfalls schädigenden Einflüsse wegen ist es notwendig, isolierte Protoplasten auf ihre Unversehrtheit hin zu überprüfen, wobei je nach dem Verwendungszweck (s. unten) verschiedene Anforderungen zu stellen sind. Für die angestrebte Repräsentativität gelten allgemein die folgenden Kriterien: (1) unbeeinträchtigtes Funktionieren der Zellmembranen als physiologische Barriere, erkennbar einerseits an der Abkugelung (Zyklose) der isolierten Protoplasten (Raj und Herr, 1971) und andererseits durch ein Kompartimentierungsvermögen gegenüber Farbstoffen, wie etwa der Ausschluss von Trypanblau durch das Plasmalemma (Kanai und Edwards, 1973b), der Einbau von Fluorescein in das Cytoplasma (Larkin, 1976) und die Akkumulation von Neutralrot in der Vakuole (Stadelmann und Kinzel, 1972); (2) Erhaltung der

physiologischen Aktivität, die meistens durch Messung der respiratorischen Sauerstoffaufnahme (Taiz und Jones, 1971; Taylor und Hall, 1976) oder des photosynthetischen Gaswechsels (Kanai und Edwards, 1973a) ermittelt wird. Neben diesen Routinekontrollen sind weitere, allerdings aufwendigere Untersuchungen für die Abklärung der Integrität der Protoplasten von Bedeutung; (3) Erhaltung der Struktur von subzellulären Partikeln; (4) Möglichkeit zur Wandresynthese und Kultivierbarkeit der Protoplasten; (5) Reaktionsfähigkeit auf Veränderungen exogener physikalischer Faktoren. Es ist wohl selbstverständlich, dass bezüglich dieser Punkte ausschliesslich vergleichende Untersuchungen zwischen den isolierten Protoplasten und den entsprechenden Zellen im intakten Gewebe Aufschlüsse liefern können. Der Umstand, dass solche differentiellen Abklärungen sehr arbeitsaufwendig sind, dürfte mit dazu beigetragen haben, dass in der Vergangenheit nur wenige Autoren diesen wichtigen Aspekten Rechnung getragen haben (Gigot et al., 1975; Taylor und Hall, 1978; Morris und Thain, 1980 a und b; Morris et al., 1981; Rubinstein und Tattar, 1980).

Was den Anwendungsbereich der Protoplastentechnik betrifft, so hat sich über das züchterische Potential hinaus (Bajaj, 1977) eine Bereicherung von weiteren Forschungsgebieten eröffnet, von welchen das Studium der ultrastrukturellen-biochemischen Grundlagen der Zellwandsynthese (Willison und Cocking, 1975; Herth und Meyer, 1977; Burgess et al., 1978; Kinnarsley et al., 1978) und der Bedeutung des Plasmalemmas für diese (Burgess et al., 1973; Robenek und Peveling, 1975; Burgess und Linstead, 1977; Schnabl et al., 1980) als besonders interessant erscheinen. Auch können Protoplasten zur schonenden Gewinnung von Zellorganellen eingesetzt werden (Kerne: Potrykus und Hoffmann, 1973; Ohyama et al., 1977. Chloroplasten: Potrykus, 1973; Edwards et al., 1978; Robinson und Walker, 1979; Somerville et al., 1981. Vakuolen: Wagner und Siegelmann, 1975; Buser und Matile, 1977; Dürr et al., 1975; Lörz et al., 1976; Saunders und Conn, 1978; Mettler und Leonard, 1979; Schmidt und Poole, 1980). Ferner werden Protoplasten als Selektionssysteme zur Gewinnung schädlingsresistenter Klone vorgeschlagen, wobei besonders widerstandsfähige Individuen ausgelesen und via Kallusse und entsprechende Wuchsstoffbehandlung intakte Pflanzen mit den gewünschten Eigenschaften erhalten werden sollen (Shepard, 1981). Schliesslich bieten sich Protoplastenisolate wegen der freien Zugänglichkeit des Plasmalemmas und der grossen Homogenität des Zellmaterials als für die Bearbeitung von membranabhängigen Phänomenen besonders geeignete Systeme an, z.B. zum Studium von Transportmechanismen (Aminosäuren: Guy et al., 1978; Rubinstein und Tattar, 1980; Paszkowsky et al., 1980. Zucker: Guy et al., 1978, 1980 und 1981; Huber und Moreland, 1980 und 1981. Ionen: Briskin und Leonard, 1979; Morris und Thain, 1980b; Volokita et al.,

1981) sowie als einfachste in vivo-Systeme bei Biogeneseuntersuchungen mit Tracersubstanzen.

Als besonders erfolgreich darf die Anwendung von Protoplasten als Experimentalsystem bei zahlreichen Studien der Photosynthese an C_3 -, C_4 - und CAM-Pflanzen bezeichnet werden (Edwards et al., 1978; Robinson et al., 1979; Morris und Thain, 1980a; Rathnam und Chollet, 1980, resp. Gutierrez et al., 1974; Kanai und Edwards, 1973a; Ku et al., 1974; Huber und Edwards, 1975, bzw. Rao et al., 1980; Chellappan et al., 1980), wobei eine schonende Separierung der Kompartimente (Robinson und Walker, 1979) zusätzlich die Möglichkeit eröffnet hat, bestimmte Enzyme (Hrazdina et al., 1978; Heck et al., 1981; Schnabl, 1981) und Metaboliten (Giersch et al., 1980; Robinson und Walker, 1980; Wirtz et al., 1980), z.B. Malat (Buser und Matile, 1977), zu lokalisieren.

Trotz der allgemein zentralen Stellung der Aepfelsäure im Stoffwechsel grüner Pflanzen liegen bisher nur wenige Arbeiten vor, die sich neben der Bedeutung des Malats im photosynthetischen C-Stoffwechsel auch mit dessen speziellen metabolischen und physiologischen Funktionen befassen, an deren Regulation die Vakuole involvierende Kompartimentierungsphänomene wesentlich beteiligt sein dürften (Matile, 1978). Zum Studium dieser Fragen bietet sich die Verwendung von Protoplasten aus Weinreben an, da diese einen relativ hohen Malatgehalt aufweisen (Hasler, 1978) und bezüglich einiger Aspekte des Aepfelsäuremetabolismus, z.B. Beeinflussung durch Klimafaktoren (Brem et al., 1981) und Beziehung zur Photorespiration (Malipiero et al., 1981), bereits recht gut untersucht worden sind.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, ein Verfahren zur Gewinnung von Protoplasten aus Blättern von Vitis vinifera auszuarbeiten, das in Bezug auf Ultrastruktur und allgemeine zellphysiologische Charakteristika für das Ausgangsgewebe repräsentative Präparationen liefert, und zwar in so hoher Ausbeute, dass die Durchführung umfassender stoffwechselphysiologischer Studien ermöglicht wird.

I I . M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

1. Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial für alle Versuche dienten Blätter von Weinreben (*Vitis vinifera* L.) der Sorte Riesling x Silvaner. Freiland-Stecklinge mit 1 oder 2 Knospen trieben je nach der vorausgegangenen Winterruhe (Aufbewahrung bei 4°C) nach wenigen Wochen Anzucht bei Raumtemperatur in Leitungswasser aus. Sobald sich die Knospen und Wurzeln kräftig zu entwickeln begannen, wurden die jungen Pflanzen mit Hydrokulturdünger (Luwasa, 3 ml/l) ernährt und durch die Wahl eines geeigneten Standorts vor direkter Sonnenbestrahlung geschützt. Die Blätter erreichten die zur Verarbeitung ideale Spreitenfläche von 15 - 35 cm² pro Blatt nach etwa 6 Wochen.

2. Isolation und Reinigung der Protoplasten

Je 1 g gewaschene Blätter wurden in 70 % Aethanol während 2 min oberflächensterilisiert, das Desinfektionsmittel wurde abgetupft und in einer Petrischale, enthaltend 0,35 M Mannitlösung, in ca. 0,5 mm breite Streifen geschnitten. Durch Abgiessen des Osmotikums und einmaliges Waschen konnten die durch das Schneiden entstandenen Zelltrümmer sowie ausgelaufene Inhaltsstoffe weitgehend entfernt werden. Die Blattstreifen wurden darauf in Petrischalen mit 12,5 ml Isolationsmedium transferiert und während 2 min im Vakuum infiltriert. Das Medium enthielt neben 2 % Cellulase (Cellulase Onozuka R-10, die lytische Wirkung auf mehrere Polysaccharide sowie Proteaseaktivität zeigt) ein von Coombe (pers. Mitt.) zur Isolation von Protoplasten aus Traubenbeeren verwendetes Gemisch folgender Substanzen:

25	mM	2-(N-morpholino)äthansulfonsäure (MES)
0,35	M	Mannit
10	mM	Cysteamin-HCl
5	mM	KCl
2	mM	CaCl ₂
2	mM	MgCl ₂
1	mM	Polyäthylenglykol 4000

Der pH-Wert wurde vor Gebrauch der Lösung mit 2 n NaOH auf 5,8 eingestellt.

Gegen den Befall durch Bakterien fügte man pro Petrischale 7 μg Actinomycin D bei und inkubierte die Ansätze anschliessend auf einem Rundschtüttler (50 Upm) im Konstantraum bei 28°C im Dunkeln. Während der fünfstündigen Einwirkung vermochte nun das Enzym die Cellulose der Zellwand so weit abzubauen, dass Loslösung der Protoplasten aus dem Gewebeverband und Austreten ins umgebende Medium möglich war.

Nach beendeter Inkubation wurden die Protoplastensuspensionen durch einen Wattebausch filtriert und die teilweise zersetzten Blattrückstände mehrmals mit frischer Inkubationslösung nachgespült. Zur Entfernung noch vorhandener Verunreinigungen, insbesondere von Tartratkristallen und kollabierten Protoplasten, schichtete man das Filtrat in 30 ml-Zentrifugengläsern direkt auf je 3 ml 20% (Gewicht) Ficoll 400 und zentrifugierte 15 min bei 3000 Upm. Die unerwünschten Partikel sedimentierten, während die Protoplasten aufgrund ihrer kleineren Dichte an der Grenzschicht aufgehalten und so konzentriert werden konnten. Die gut sichtbare grüne Bande wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Eine Prüfung im Lichtmikroskop zeigte, dass nur noch vereinzelte Verunreinigungen zurückgeblieben waren.

Das routinemässige Auszählen von Suspensionsanteilen in einer Zählkammer nach Neubauer erfolgte unmittelbar nach dem Reinigungsschritt. Um den Verlust von Protoplasten während der Stufengradientenzentrifugation zu überprüfen, führte man aber auch Ausbeutebestimmungen an Rohsuspensionen durch, was zeigte, dass bis zu 45 % der Protoplasten bei diesem Schritt ausgeschieden wurden. Die sedimentierte Population beinhaltete jedoch hauptsächlich auf Vitalfärbungen nicht mehr ansprechende und somit offenbar geschädigte Individuen, die sich so in einfacher Art und Weise aus den Präparaten eliminieren liessen. Um die Genauigkeit der Zählmethode zu überprüfen, pipettierte man aus einer Protoplastensuspension eine Verdünnungsreihe, bestimmte zur Kontrolle den Chlorophyllgehalt und ermittelte in allen Stufen die Anzahl Protoplasten (Tab. 1). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im folgenden die Anzahl Protoplasten als Bezugsgrösse für die Messungen des Aepfelsäuregehalts verwendet.

Tab. 1: Reproduzierbarkeitskontrolle des Auszählens von Protoplasten in einer Neubauerkammer durch Bestimmung der Linearität von verschiedenen Parametern in einer Verdünnungsreihe.

Protoplasten-suspension (ml)	Volumen total (ml)	Protoplasten- (Anzahl / μ l)	Chlorophyll (μ g / ml)
2,5	2,5	6490	42,08
2,5	3,0	5700	34,99
2,5	3,5	4670	30,24
2,5	4,0	3960	26,82
2,5	4,5	3830	23,93
Linearität: r^2	1,0	0,97	0,98

3. Histochemische Tests

Trypanblau: (Kanai und Edwards, 1973b)

Zum Nachweis der Funktionstüchtigkeit der Plasmamembran wurden Protoplastenpräparationen im Verhältnis 1 : 1 mit 2,5 % Trypanblau in 0,35 M Mannitlösung gemischt. Im Lichtmikroskop konnte der Ausschluss des Farbstoffes durch die intakte Membran anhand des Auftretens von ungefärbten Protoplasten vor blauem Hintergrund festgestellt werden.

Fluoresceindiaceetat: (Larkin, 1976)

Der Einbau von Fluorescein ins Cytoplasma bestätigt ebenfalls das Funktionieren des Plasmalemmas als physiologische Barriere, indem gezeigt werden kann, dass geeignete Substanzen zur Permeation durchaus befähigt sind. Dazu wurden 20 μ l Fluoresceindiaceetat (5 mg/ml Aceton) zu 1 ml gereinigter Protoplastensuspension gegeben, so dass eine Endkonzentration von 0,01 % resultierte. Nach Permeation durch die Membran werden die zwei Acetatreste von cytoplasmatischen Esterasen abgespalten, was den Fluoresceinmolekülen ermöglicht, von der Innenseite her an die Membran zu binden. Dies konnte nach etwa 5 min Einwirkzeit bei Raumtemperatur am Auftreten von Fluoreszenz im cytoplasmatischen Bereich der Protoplasten in einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

Neutralrot: (Stadelmann und Kinzel, 1972)

Aufgrund der pH-Abhängigkeit der Farbbase eignet sich das Phänomen der Akkumulation von Neutralrot in der Vakuole als funktioneller Test für den Tonoplasten. Durch Protonierung im sauren Milieu des Vakuoleninhalts ist der Farbstoff positiv geladen und damit am Passieren der Membran gehindert und in der Vakuole angereichert. In den vorliegenden Experimenten wurde eine wässrige Lösung von 0,1 % Neutralrot und 0,35 M Mannit bei pH 7 zu sedimentierten Protoplasten gegeben.

Färbung der Zellwand: (Nagata und Takebe, 1970)

Frisch isolierte Protoplasten wurden mit 0,1 % Calcofluor White-M2R in 0,35 M Mannitlösung versetzt und auf das Vorhandensein eventueller Zellwandreste im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Aufhellung des Blattgewebes zur Lokalisation von Idioblasten: (Braune et al., 1967)

Blattstücke von 0,5 - 1 cm² wurden während 2 min mit siedendem Aethanol extrahiert und darauf in einer 27 proz. Lösung von Chloralhydrat in Wasser eingelegt. Im Verlaufe einiger Stunden hellt sich das Gewebe auf und erscheint bis auf die Wandstrukturen sowie allfällige kristalline Einschlüsse im Lichtmikroskop transparent.

4. Elektronenmikroskopie

Dünnschnittechnik:

Nach Zentrifugation der Protoplastensuspensionen (100 g, 10 min) wurde das Sediment 1 Std. bei Raumtemperatur in 2,5 % Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (1/15 M, pH 7,4) vorfixiert, zweimal gewaschen und anschliessend in 4 % Osmiumtetroxid im gleichen Puffer während 1 Std. fixiert. Zu Beginn der Entwässerung in einer Acetonreihe (75 - 100 %) mischte man das Protoplastensediment vorsichtig mit wenig warmem Agar (3 %), schnitt nach dem Erkalten ca. 1 mm³ grosse Agarblöckchen und bettete diese nach vollendeter Dehydrierung in Spurr-Medium ein (Spurr, 1969). Frische Blattstücke wurden in analoger Weise behandelt, wobei jedoch die Fixierung in Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid 3 Std. dauerte und die Entwässerung und Einbettung der Objekte ohne Agarzugabe erfolgte.

Zur Herstellung der Ultradünnschnitte diente ein LKB-Ultratom III mit Diamantmesser.

Zur Lichtmikroskopie von Blattquerschnitten (Abb. 4b) wurden Semidünnschnitte mit 1 % Methylenblau gefärbt.

Gefrierätztechnik:

Tropfen von konzentrierten Protoplastensuspensionen wurden ohne Gefrierschutz auf Goldplättchen ($\varnothing$ 3 mm) durch Eintauchen in schmelzendes Stickstoffeis eingefroren. Die Herstellung der Präparate erfolgte nach der Methode von Moor und Mühlethaler (1963) auf einer Balzers 360 M, wobei man die Bruchflächen während 2 min bei -100°C ätzte und die Schichtdicke der nachfolgenden Pt/C-Bedampfung mit einem Quarzkristall kontrollierte. Nach Reinigung der Abdrücke in 70 % (Vol.) Schwefelsäure (ca. 14 Std.) wurden diese mehrmals mit H_2O dest. gewaschen.

Die Schnitte und Abdrücke wurden auf formvarbefilmten Cu/Pd-Netzchen in einem Hitachi HS-8 Elektronenmikroskop bei 50 kV untersucht.

5. Enzymatische Bestimmung der Aepfelsäure

Die Substratkonzentration wurde anhand der Zunahme von reduziertem NADH gemessen, welches bei der Oxidation von L-Aepfelsäure zu Oxalessigsäure mittels Malatdehydrogenase (MDH) aus NAD entsteht.



Da das Gleichgewicht für den gewünschten Reaktionsablauf ungünstig liegt, wurde, um eine vollständige Umsetzung der Aepfelsäure zu erreichen, die Oxalessigsäure durch Hydrazonbildung abgefangen.



Testansatz : (Gutmann und Wahlefeld, 1974; leicht modifiziert)

0,40 M	Glycin	} Puffer pH 9,3
1,33 M	Hydrazin	
0,79 mM	NAD	
5-100 μM	Substrat (Extrakt)	
10-60 $\cdot\text{U}$	MDH	

in einem Gesamtvolumen von 2,9 ml

Das vollständige Ablaufen der Reaktion wurde während der Messung in einem Spektralphotometer (Uvikon 810) in Glasküvetten bei 340 nm und 35°C auf einem linearen Kompensationsschreiber (Uvikon Rekorder 21) überprüft und der Malatgehalt bei Absorptionskonstanz rechnerisch auf einem Commodore Professional Computer 3023 ermittelt, wobei letzterer nach einem eigens erstellten Programm die Konzentrationsberechnungen durchführte.

6. Quantitierung von Chlorophyll (Arnon, 1949)

Blattmaterial: 0,1 - 0,3 g frisches Blattmaterial wurde fein zerschnitten in 15 ml 80 % Aceton bis zur Entfärbung des unlöslichen Rückstands unter Eiskühlung in einem Potter-Homogenisator verrieben. Feste Zelltrümmer liessen sich durch Zentrifugation (1200 g, 5 min) entfernen, so dass die Absorption des Ueberstands nach geeigneter Verdünnung im Photometer bei 663 nm und 645 nm gegen 80 % Aceton gemessen werden konnte. Die Berechnung basierte auf folgender Formel:

$$\text{mg Chl(a+b)/ml} = (E_{645} \times 20,2) + (E_{663} \times 8,02) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Protoplasten: Da das Inkubationsmedium mit dem Extraktionsmittel eine störende milchige Emulsion bildete, wurden die Protoplasten zunächst durch Zentrifugieren (1200 g, 10 min) von diesem getrennt. Extraktion der Sedimente erfolgte in 80 % Aceton, die Entfernung unlöslicher Partikel aus der Chlorophyll-Lösung mittels Zentrifugation.

7. Extraktaufbereitung

Herstellung der Rohextrakte:

Mit der Schere grob zerkleinerte Blattstücke wurden in H₂O dest. während 2 min aufgekocht und im Potter-Homogenisator fein zerrieben. Die Wandrückstände separierte man durch Zentrifugation (1200 g, 10 min) und verwendete nach Bestimmung des Volumens den Rohextrakt direkt zur Messung der Aepfelsäurekonzentration. Gereinigte Protoplastensuspensionen wurden im Wasserbad während 2 min aufgekocht, nach dem Erkalten zentrifugiert und wie die Blattextrakte weiterverwendet.

Fraktionierung der Rohextrakte:

Rohextrakte aus Blättern und Protoplasten wurden mittels Ionenaustauscherharzen nach der Methode von Calvin und Beevers (1961) fraktioniert. Dies erfolgte durch Passage des Extraktes über zwei hintereinandergeschaltete Säulen (5 mm x 100 mm) mit stark saurem (Dowex 50W X8, H^+ -Form) und stark basischem Harz (Dowex 1 X8). Der Ionenaustauscher wurde vorgängig von der Chlorid- in die Formiatform umgeladen. Die Fraktion der organischen Säuren wurde mit 50 ml 4 n Ameisensäure und 50 ml H_2O mit einer Geschwindigkeit von 1-1,5 ml/min von der Anionenaustauschersäule eluiert, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und anschliessend gaschromatographisch analysiert.

Aufbereitung von Protoplasten in Tracerversuchen:

2 - 3 Parallelansätze (je 4,1 ml) wurden vereinigt und die Protoplasten durch schonendes Zentrifugieren (100 g, 20 min) sedimentiert. Nach sorgfältigem Absaugen des Ueberstands wurde das Sediment sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, während des Auftauens mit 15 ml eines Gemisches von Methanol/Chloroform/0,2 M Ameisensäure (60/25/15) (Kennedy und Williams, 1977) versetzt und von unlöslichen Komponenten durch Zentrifugation (1200 g, 5 min) befreit. Der Ueberstand wurde in einen Spitzkolben transferiert, im Rotationsverdampfer bei 30°C zur Trockene eingedampft und in 400 μl H_2O dest. aufgenommen.

8. Chromatographische Methoden

Gaschromatographie:

Die organischen Säuren wurden als Trimethylsilyl-(TMS)-Derivate analysiert. Hierzu versetzte man die über Phosphorpentoxid getrockneten Extrakte mit 100 μl N,O-bis(trimethylsilyl)-acetamid und liess über Nacht bei 60°C im verschlossenen Gefäss reagieren. Die Auftrennung erfolgte in einem Gaschromatographen vom Typ Carlo Erba Fractovap 2101 AC mit Flammenionisationsdetektor. Als Trägergas diente Stickstoff (30 ml/min); die Glassäule (3 m lang, Innendurchmesser 2 mm) war gefüllt mit 3 % SE-30 auf Varaport 30 (100/120 mesh). Das Temperaturprogramm betrug 8°C/min von 100-220°C. Injektor und Detektor wiesen eine Temperatur von 240°C auf.

Dünnschichtchromatographie:

Zur zweidimensionalen dünnschichtchromatographischen Auftrennung von ^{14}C -markierten Stoffwechselprodukten wurden direkt die wässrigen Rohextrakte eingesetzt. Sämtliche Auftrennungen erfolgten auf Celluloseplatten (Schichtdicke 0,1 mm; Merck Nr. 5716).

Die zu analysierenden Substanzgemische wurden punktförmig in einer Ecke der Platte aufgetragen. Um in der ersten Dimension eine Laufzeit von 24 Std. zu ermöglichen, wurde am oberen Plattenrand eine Ueberlaufvorrichtung, ein in Zacken auslaufendes Stück Chromatographiepapier Whatmann 3MM, angebracht.

Es wurden die folgenden Fließmittel verwendet:

1. Dimension: Isobuttersäure - n-Butanol - Isopropanol - n-Propanol - H_2O - NH_3 aq. 25 % - EDTA (100/3/3/14/38/3/0,048; v/v/v/v/v/v/w; Feige et al., 1969). Anschliessend während 48 Std. trocknen lassen.
2. Dimension: 2-Butanol - Ameisensäure - H_2O (6/1/2; v/v/v; Schürmann, 1969)
 - a) Fließmittel 14 cm aufsteigen lassen; mit Fön trocknen
 - b) Fließmittel 17 cm aufsteigen lassen

Die Identität der aufgetrennten Probenkomponenten wurde durch Cochromatographie mit authentischen Substanzen ermittelt (Malipiero et al., 1981), die Radioaktivität durch Autoradiographie sowie quantitative Bestimmung im Szintillationszähler nach Auskratzen der Flecken (s. unten).

9. Tracerversuche

1 ml einer Suspension von gereinigten Protoplasten (ca. 4×10^6 /ml) wurde in Messröhrchen mit 3 ml Pufferlösung - 0,35 M Mannitlösung als Osmotikum enthaltend - versetzt und während 5 Std. im Wasserbad bei $25^{\circ}C$ inkubiert. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampflampe (Phillips HPLN 400 W) im Abstand von 40 cm vom Objekt. Bei den Dunkelansätzen wurden die Reagenzgläser mit Alufolie umwickelt. Die Supplementierung erfolgte unmittelbar vor der Inkubation durch Pipettieren von je 0,1 ml Stammlösung, so dass sich also im Standardansatz die in Tab. 2 angegebenen Konzentrationen und Aktivitäten ergaben.

Die Aufbereitung und Chromatographie der Extrakte erfolgten nach den in II. 7. und II. 8. gegebenen Beschreibungen.

Zur Ueberprüfung der Trennleistung bei zweidimensionaler Chromatographie wurde die Radioaktivitätsverteilung auf den Platten mittels DC-Scanning mit einem 2π -Proportionalzählrohr erfasst (Berthold Dünnschichtscanner II mit Messplatz LB 242 K; Methan; 2700V). Zur genauen Lokalisation radioaktiv markierter Stoffwechselprodukte wurden Röntgenfilme (Agfa Osray T4 und Agfa Gevaert Curix RP-2) auf die Celluloseschicht gepresst und während 25 d im Dunkeln exponiert. Entwicklung und Fixierung des belichteten Films erfolgten mit Agfa G 150 bzw. G 305.

Tab. 2: Standardtestsyst $\ddot{u}$ m f $\ddot{u}$ r Stoffwechseluntersuchungen an Mesophyllprotoplasten von Vitis vinifera. Inkubation: 5 Std. bei 25 $^{\circ}$ C. F $\ddot{u}$ r die Herstellung der Protoplastensuspensionen (ca 1 x 10 6 /ml Inkubationsmedium) vgl. II. 2.

Zusatz zum Inkubationsmedium (Puffer *)	Konzentration (mM)	Totalaktivit $\ddot{a}$ t (μ Ci)
NaHCO $_3$	5 - 12,5	-
NaH 14 CO $_3$	12,5	10
Glucose	5	-
U- 14 C-Glucose	5	1
U- 14 C-Serin	5	1
ATP	5	-

* Wenn nichts anderes erw $\ddot{a}$ hnt, betrug der pH-Wert 7,5 (Phosphatpuffer nach Soerensen, 1/15 M, Totalvolumen 4,1 ml).

Die Radioaktivit $\ddot{a}$ t w $\ddot{a}$ ssriger L $\ddot{o}$ sungen (5 μ l - 0,1 ml) sowie der aus DC-Platten ausgekratzten markierten Substanzen wurde in je 10 ml Z $\ddot{a}$ hlmedium (Lumagel) mit einem der folgenden Szintillationsz $\ddot{a}$ hler ermittelt: Nuclear Chicago Unilux II, Beckmann LS-100 C oder Beckmann LS-7800. Die Berechnung der Ausbeute erfolgte aufgrund des Kanalverh $\ddot{a}$ ltnisses oder mittels eines externen Standards (137 Cs).

10. Herkunft spezieller Chemikalien

Cellulase Onozuka R-10	Yakult Biochemicals, Japan
Actinomycin D	Calbiochem, Los Angeles, California, USA
Fluoresceindiacetat	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Calcofluor White-M2R	Polysciences Inc. Warrington, PA, USA
NaH 14 CO $_3$, U- 14 C-Glucose, U- 14 C-Serin	Radiochemical Centre, Amersham, England

III. RESULTATE

Die Gewinnung von Protoplasten aus dem Blatt von Vitis vinifera stellt ein bisher ungelöstes Problem dar (vgl. Einleitung). Wie aus Vorversuchen hervorging, besteht eine der experimentellen Schwierigkeiten zur erfolgreichen Isolation solcher Präparationen darin, dass sich bei Inkubation von Blattgewebestreifen in Cellulaselösungen eine rasche und intensive Braunfärbung des Materials zeigt, welche zweifellos durch unter der Wirkung von Phenoloxidasen entstehende Polymerisationsprodukte von aus Phenolen gebildeten Chinonen hervorgerufen wird. Die bei der Oxidation von Phenolen auftretenden Intermediärprodukte sind nun aber sehr reaktiv und gehen mit Protein - und wohl auch mit Cellulose - kovalente Bindungen ein (van Sumere et al., 1974), so dass die Zelloberfläche 'gegerbt' und damit die notorische Schwierigkeit, Protoplasten aus Weinrebenblättern zu gewinnen, verständlich wird. Tatsächlich konnten bei Verhinderung der Melanisierung durch Cystein oder Cysteamin ohne weiteres physiologisch intakte Protoplasten gewonnen werden (s. unten). Allerdings spielt auch die Art der zur Isolation verwendeten Cellulase eine entscheidende Rolle, zeitigte doch selbst unter reduktiven Bedingungen von den zahlreichen getesteten Cellulasepräparaten nur gerade Cellulase 'Onozuka R-10' die gewünschte Wirkung.

1. Isolation von Protoplasten

Wie Abb. 1 zeigt, steigt die Ausbeute an Protoplasten mit zunehmender Inkubationsdauer nach einer Anlaufphase von ca. 2-3 Std. stark an und erreicht nach insgesamt 7 Std. ein Maximum. Nachher nimmt die Totalzahl an vitalen Protoplasten rasch ab, was auf eine zunehmende Schädigung der Zellmembran unter der Einwirkung der Cellulasepräparation (die ja auch Proteaseaktivität aufweist, vgl. II. 2.) zurückzuführen sein dürfte. Deshalb wurde der Isolationsvorgang jeweils nach 5 Std. abgebrochen und so eine 'Ernte' von ca. 60 % des Maximalertrags an zumindest optisch einwandfreien Individuen erreicht. Belichtung während der Inkubation hat einen negativen Effekt - sowohl quantitativ als auch qualitativ: es traten weniger Protoplasten auf und es sind mehr geschrumpfte und mit anderen aggregierte Individuen vorhanden. Im Normalfall konnten aus 1 g Blattmaterial $40 - 50 \times 10^6$ Protoplasten isoliert werden, wobei 30×10^6 und 70×10^6 die beobachteten Extremwerte darstellen. Diese Angaben beziehen sich auf gradientgereinigte Suspensionen, wie sie routinemässig

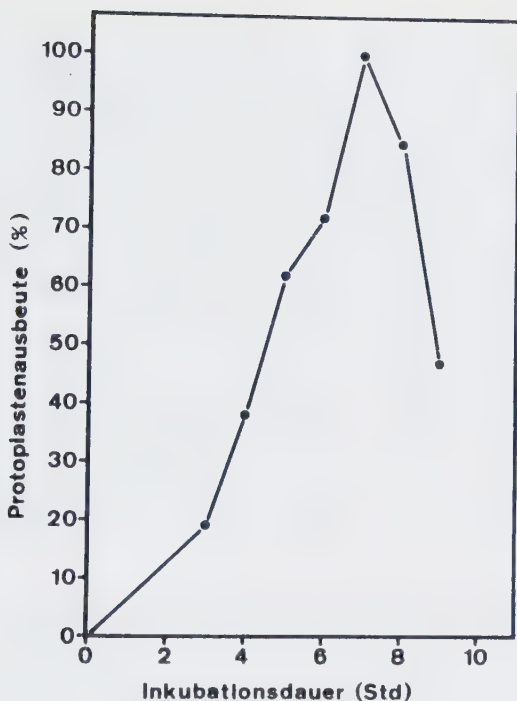


Abb. 1 Beziehung zwischen der Dauer der Inkubation von Blattgewebe aus *Vitis vinifera* in einer Cellulaselösung (für Details vgl. II. 2.) und der Ausbeute an Protoplasten (in % des Maximalertrags)

in allen Versuchen zur Verwendung gelangten. Die ursprüngliche Ausbeute war wesentlich höher (vgl. II. 2.).

1.1. Einfluss von Blattalter und Kultivationsbedingungen auf die Ausbeute von Protoplasten

Die Beobachtung, wonach Blätter von im Sommer bei direkter Sonneneinstrahlung kultivierten Stecklingen keine Protoplasten liefern, dürfte auf dem in diesem Zusammenhang bereits von Cassels und Barlass (1976) für Tomatenblätter beschriebenen Phänomen der 'summer hardiness', durch strukturelle Veränderungen

des Pektins und eine Verdickung der Wand verursacht (Edgington et al., 1961), beruhen und stellt auch eine mögliche Erklärung für die negativ verlaufenen Versuche von Skene (1977) dar, aus Weinrebenblättern Protoplasten zu isolieren. Die unterschiedliche Eignung von unter verschiedenen Umweltsbedingungen gewachsenen Blättern zeigt sich auch darin, dass selbst eine leichte Erhöhung der normalen Anzuchttemperatur (25°C) zu Blattmaterial führt, das nach der Ernte sofort seine Turgeszenz verliert und anschliessend durch die Cellulasebehandlung vollständig zersetzt wird. Ähnliche Resultate ergab von echtem Mehltau befallenes Material, wobei dieser Misserfolg wohl auf einer infektionsbedingten Schwächung des Plasmalemmas beruhen dürfte. Neben diesen durch ökologische Faktoren bedingten Unterschieden gibt es aber auch einen entwicklungsphysiologischen Parameter, zeigte sich doch eine deutliche Korrelation zwischen der Blattgrösse und der Effizienz des Isolationsverfahrens. Als besonders geeignet erwiesen sich junge Blätter mit einer Spreitenfläche von $10\text{--}40\text{ cm}^2$, während sonst sehr kleine, aber auch ausgewachsene Blätter wesentlich geringere Protoplastenausbeuten erbrachten.

1.2. Zellphysiologische Merkmale von Rebenprotoplasten

Die Protoplastenpopulationen wurden routinemässig sowohl unmittelbar nach Abbruch der Cellulasebehandlung als auch nach der Gradientenzentrifugation im Mikroskop inspiziert. Als Hauptkriterium für den Erfolg des Isolationsganges diente dabei das Auftreten von wandfreien, perfekt kugelförmigen Individuen (Abb. 2 a), also von echten Protoplasten (vgl. Einleitung). Der Protoplastendurchmesser variiert zwischen den Extremwerten von 10 und $35\text{ }\mu\text{m}$, wobei sich aber deutlich eine Grössenklasse im Bereich von etwa $20\text{ }\mu\text{m}$ abhebt, die den Hauptanteil der gesamten Population darstellt. Extrem kleine Individuen, infolge von Plasmolyseeffekten während der Isolation oder auch später durch Abschnürung als sog. Subprotoplasten (Ruesink und Thimann, 1966) entstehend, traten sehr selten auf. Obwohl Schwammparenchym gelegentlich Zellen mit wesentlich grösserem Durchmesser als $35\text{ }\mu\text{m}$ aufweist, wurden jedoch keine entsprechenden Protoplasten beobachtet. Sie scheinen demnach der mechanischen Beanspruchung des Schüttelns bzw. der Zentrifugation nicht Widerstand bieten zu können und kollabieren so vermutlich bereits während der Aufbereitung. Bei frisch isolierten Protoplasten besetzen die Chloroplasten die Peripherie mehr oder weniger gleichmässig, während sie, besonders ohne Wechseln des Inkubationsmediums, sich nach längerem Aufbewahren bei Raumtemperatur zu einer Polkappe zusammenschieben.

1.3. Vitalitätstests

Um die physiologische Integrität der so isolierten Protoplasten zu überprüfen, wurden einige ihrer Reaktivitäten untersucht, nämlich (i) das Ausschlussvermögen gegen Trypanblau, das die intakte Plasmamembran nicht zu permeieren vermag (Kanai und Edwards, 1973b), so dass sich funktionstüchtige Protoplasten im Mikroskop vom blauen Hintergrund gelb-weiss abheben (Abb. 2 b), (ii) die Fähigkeit zur Fluoreszenz nach Applikation von Fluoresceindiacetat, welches das Plasmalemma, nicht aber den Tonoplasten zu durchdringen vermag und im Cytoplasma enzymatisch in die fluoreszenzmikroskopisch feststellbare Molekülspezies transformiert wird (Larkin, 1976 ; II. 3.)(Abb. 2 c), (iii) Akkumulation von Neutralrot in der Vakuole (Stadelmann und Kinzel, 1972) und (iv) stoffwechselphysiologische Reaktivität (Veränderung im Aepfelsäurepool und der CO_2 -Fixierungsrate) bei Alterationen des pH-Wertes im Medium. Die diesbezüglichen Resultate sind in den Abbildungen 2 b-d sowie in Abschnitt III. 4. dargestellt. Das hier ausgearbeitete Isolationsverfahren liefert demnach nicht nur hohe Ausbeuten (s. oben) sondern auch Protoplasten von ausgezeichneter Vitalität.

2. Vergleich der Ultrastruktur von Rebenblättern mit derjenigen von daraus isolierten Protoplasten

Wie einleitend erwähnt, besteht bei Verwendung von Cellulase zur Isolation von Protoplasten stets die Gefahr einer Schädigung des Plasmalemmas (Hall und Wood, 1970; Schenk und Hildebrandt, 1969), die zweifellos auch auf den Stoffwechselbereich übergreifen würde. Zudem kann auch der osmotische Stress, dem die Protoplasten während der Inkubation in der Enzymlösung ausgesetzt sind, zu strukturellen Veränderungen führen (Taylor und Hall, 1978), die allerdings teilweise reversibel sind. Die folgenden Untersuchungen dienen dazu, allfällige, durch das Isolationsverfahren hervorgerufene Alterationen in der Struktur der Blattzellen festzustellen.

Wie allgemein vom jungen Blatt bekannt, ist auch bei V. vinifera noch keine deutliche Gliederung in Schwamm- und Palisadenparenchym erkennbar. Auch besitzen die einzelnen Zellen (Abb. 3 a), untereinander durch zahlreiche Plasmodesmen verbunden, noch keine Zentralvakuole. Die Chloroplasten fallen durch ihren geringen Gehalt an Granalamellen und die entsprechend spärlich ausgebildeten Thylakoidstapel auf. Im Gegensatz dazu zeigen solche Blätter, wie sie hier zur routinemässigen Isolation von Protoplasten verwendet wurden, die bekannte anatomische Gliederung des Laubblattes (Abb. 4 b), und alle Organellen sind voll ausgebildet (Abb. 3 b). In einzelnen Zellen konnten grobkörnige,

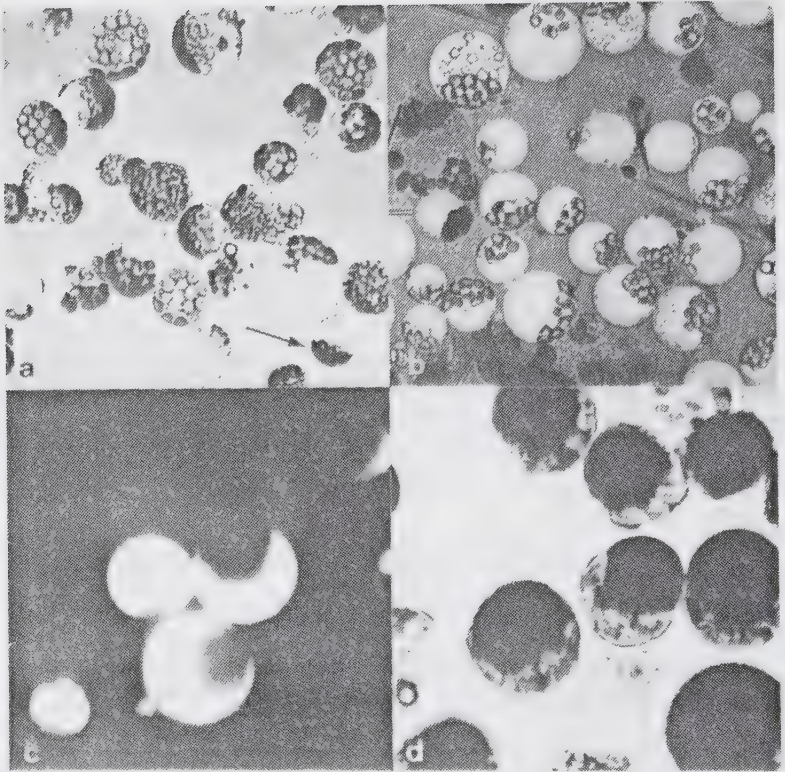


Abb. 2 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Rebenprotoplasten

- a Frisch isolierte Protoplasten, Zyklöse zeigend. Der Pfeil weist auf ein Chloroplastenaggregat, das eine Polkappe bildet (380x)
- b Ausschluss von Trypanblau durch die intakten Protoplasten (280x)
- c Fluoreszierende Protoplasten nach Applikation von Fluorescein-diäcetat (540x)
- d Protoplasten nach Akkumulation von Neutralrot in der Vakuole (550x)

elektronendichte Inkrustationen entlang der Vakuolenmembran festgestellt werden, die auf den hohen Gehalt des Rebenblattes an phenolischen Substanzen zurückzuführen sein dürften. Da die Zellen des Schwamm- und des Palisadenparenchyms sich ausser ihrer Form nicht unterscheiden, ist somit keine Aussage über die histologische Herkunft der einzelnen Protoplasten möglich. Immerhin werden kaum chloroplastenfreie Individuen gefunden, was die beiden erwähnten Gewebetypen als die Ausgangsbereiche fixiert und damit den Ausdruck 'Mesophyllprotoplasten' rechtfertigt. Als Besonderheit sind die im Mesophyll von Weinrebenblättern recht zahlreich vorkommenden, extrem grossen, Kristalle enthaltenden Zellen zu nennen (Abb. 4), die im Blattquerschnitt stets an der Grenze zum Schwammparenchym in der Nachbarschaft etwas verkürzter Palisadenzellen auftreten. Ultrastrukturell zeichnen sich diese Idioblasten durch ihren stark vesikulösen Cytoplasmaschlauch aus, der offenbar vorwiegend degenerierende Organellen - im abgebildeten Exemplar noch vereinzelt Mitochondrien, Teile des endoplasmatischen Retikulums sowie einen Plastiden - enthält. Intakte Chloroplasten konnten in solchen Zellen nur in einem einzigen Fall beobachtet werden. Da nur selten aus Idioblasten hervorgegangene Protoplasten (Abb. 4 d) gefunden werden konnten, ist anzunehmen, dass diese aufgrund ihrer Grösse und der möglicherweise verletzenden Kristallbündel der mechanischen Beanspruchung des Isolationsprozederes nicht gewachsen sind. Das massenhafte Auftreten von aus dem Raphidenverband losgelösten Tartratsnadeln in ungereinigten Protoplastensuspensionen steht mit dieser Annahme im Einklang. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten isolierter Protoplasten zeigen (Abb. 5), dass sowohl die Struktur der Zellorganellen als auch deren Anordnung durchaus repräsentativ für die Verhältnisse im intakten Blatt (Abb. 3 b) sind. Spezielle Aufmerksamkeit wurde dem allfälligen Auftreten bestimmter Strukturveränderungen, wie Blähungen der Kernmembran, Aufrollen des endoplasmatischen Retikulums und aberranten Formen von Chloroplasten und Mitochondrien, gewidmet, da solche Erscheinungen als Nebeneffekte der Anwendung von Actinomycin - hier ja Bestandteil des Isolationsmediums (vgl. II. 2.) - bekannt sind (Robinson und Schlösser, 1978). Wohl wegen der im vorliegenden Fall nur minimalen Dosen des Antibiotikums konnten jedoch nie entsprechende Alterationen beobachtet werden (Abb. 5). Den wesentlichsten Unterschied zwischen der Blattzellen- und Protoplastenstruktur stellt das Auftreten von dunklen, amorphen Kugeln im Cytoplasma ('osmiophilic bodies'; Taylor und Hall, 1978) dar, die eventuell als Artefakt während der Isolation entstanden sind (vgl. Diskussion). Auch scheint die Anzahl der in den Chloroplasten liegenden Plastoglobuli im abgebildeten Exemplar leicht erhöht zu sein. Die in den Vakuolen von Protoplasten vorgefundenen kugelförmigen Gebilde sind vermutlich den elektronendichten Anlagerungen

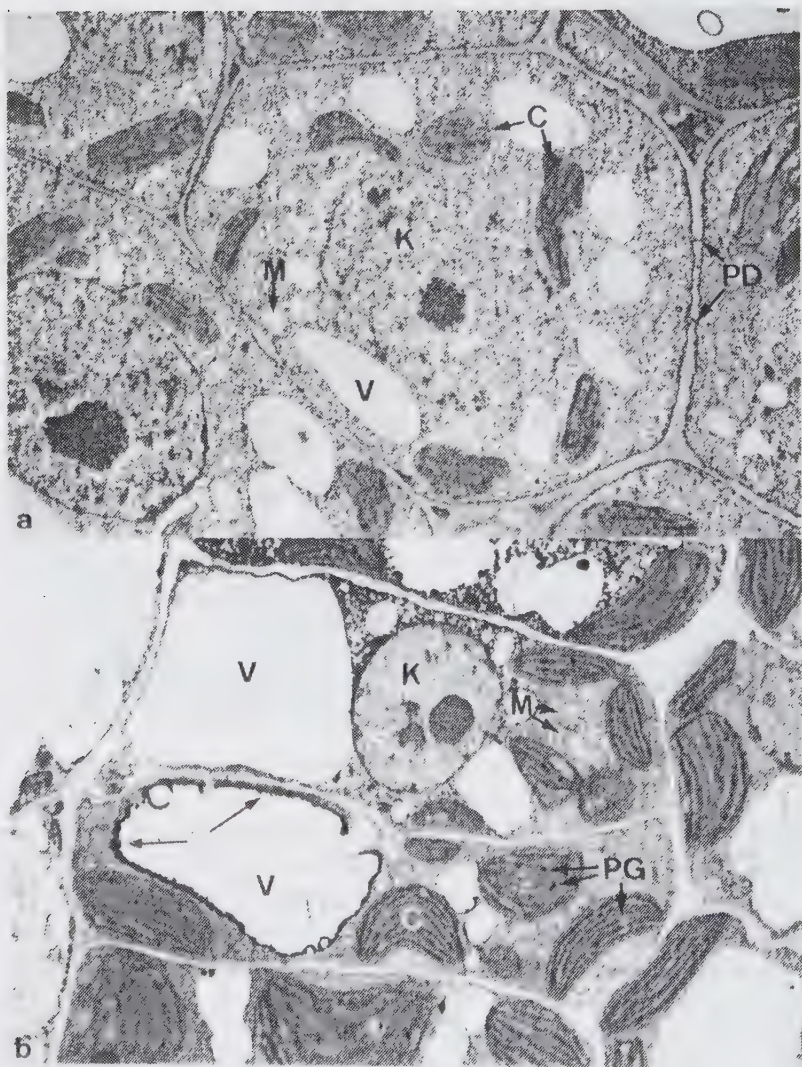


Abb. 3

an die Vakuolenmembran der Blattzellen gleichzusetzen. Es handelt sich dabei möglicherweise um Polymerisationsprodukte von Phenolen, ist doch das Auftreten solcher Einschlüsse in stark tanninhaltigen Zellen durchaus bekannt (Baur und Walkinshaw, 1974; Müller und Greenwood, 1978).

Das gelegentliche Auftreten von Riesenprotoplasten (Abb. 6) beruht hingegen eindeutig auf einem Einfluss, der sich erst nach der Isolation der involvierten Zellen aus dem Blattgewebe auf diese auswirkt. Endomitose fällt hierfür ausser Betracht, da jeweils nicht nur die Anzahl der Kerne, sondern im entsprechenden Ausmass auch diejenige der Organellen erhöht war. Die Mehrkernigkeit muss damit als Ergebnis wiederholter Protoplastenfusionen angesehen werden. An sich könnte die Anwesenheit einer Reihe von bekannten fusiogenen Agenzien, wie Polyäthylenglykol 4000, Na^+ , K^+ , Mg^{++} und Ca^{++} (Wallin et al., 1974), die, wenn auch in vergleichsweise niedriger Konzentration, im Isolationsmedium vorliegen, hierfür verantwortlich gemacht werden. Weitergehende Untersuchungen zeigten jedoch, dass in Rohpräparaten, also vor der Gradientenzentrifugation, nie fusionierte Protoplasten auftraten. Damit reduziert sich deren Anfälligkeit für Verschmelzungen auf den Reinigungsschritt. Ob das zur Herstellung verwendete Zuckerpolymer Ficoll 400 als alleiniger Verursacher der Fusionen angesehen werden muss, oder ob die bei der Zentrifugation auftretenden, gegenseitigen Appressionen der Protoplasten die Verschmelzung zusätzlich begünstigt, kann nicht entschieden werden.

Abb. 3 Elektronenmikroskopische Bilder von Dünnschnitten aus Blättern von Rebenstecklingen verschiedenen Alters

- a Junges Blatt (ca. 5 cm²): Membransystem der Chloroplasten spärlich, Granathylakoidstapel noch nicht vollständig entwickelt; mehrere kleine Vakuolen mit scharf abgegrenztem Tonoplast (7400x)
- b Aelteres Blatt (ca. 30 cm²): Chloroplasten voll entwickelt, dem C₃-Typ entsprechend; Zentralvakuole teilweise mit elektronendichtem Membranbelag (lange Pfeile); osmiophiles granuläres Material teilweise auch im Cytoplasma vorhanden (s. Zelle am oberen Bildrand) (5900x)

Abkürzungen: C, Chloroplast; K, Kern; M, Mitochondrium; V, Vakuole; PD, Plasmodesmen; PG, Plastoglobuli

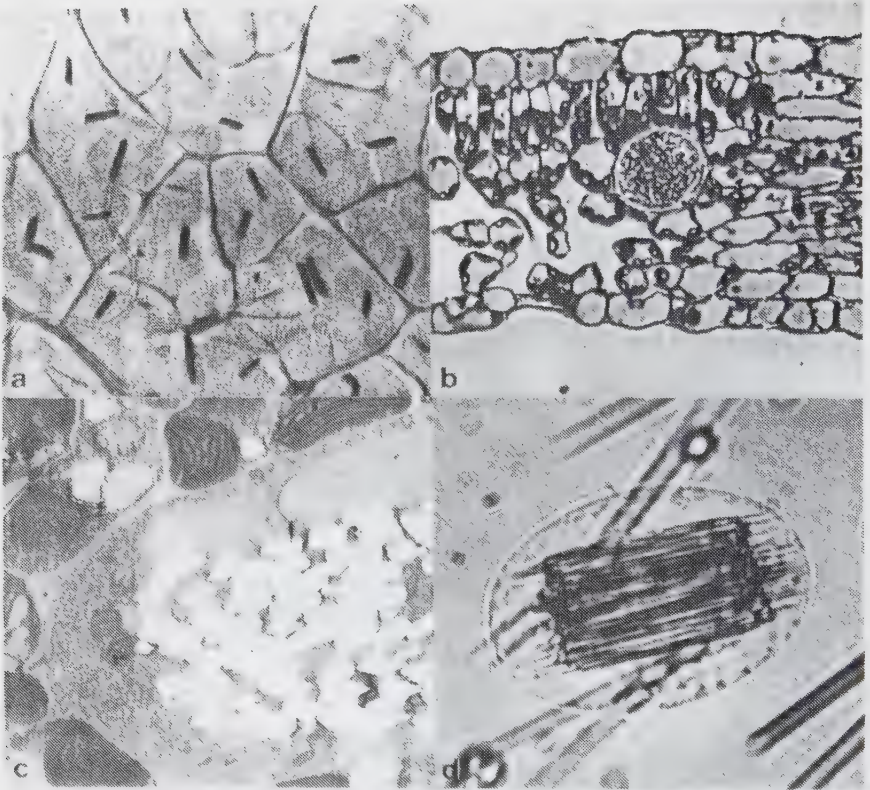


Abb. 4 Lokalisation und Struktur von kristallhaltigen Zellen im Blattgewebe von *V. vinifera*

- a Aufsicht auf Rebenblatt (nach Behandlung mit Chloralhydrat), ziemlich regelmässige Verteilung der Kristallzellen zeigend (75x)
- b Querschnitt durch Rebenblatt (Methylenblau-Färbung), Idioblast an der Grenze zwischen Palisaden- und Schwammparenchym liegend (420x)
- c Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Idioblasten: Kristallbündel im Querschnitt (4400x)
- d Protoplast mit kristallinem Inhalt (Ca-Tartrat: Ruffner, 1982) (1100x)

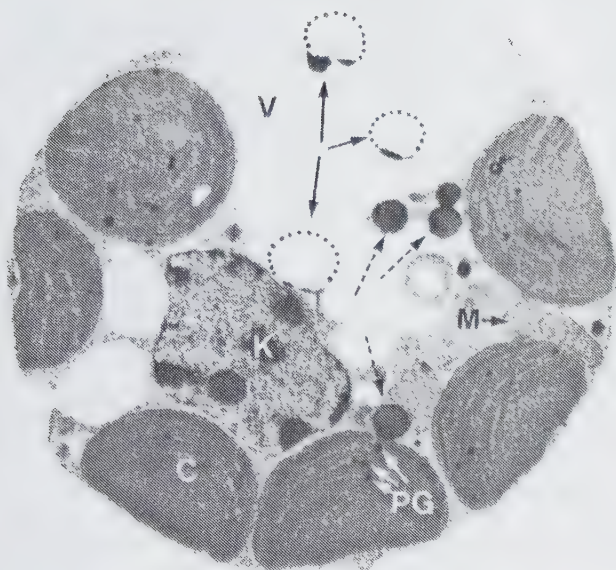


Abb. 5 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Protoplasten aus dem Meso-
phyll von *V. vinifera*. Die Ultrastruktur der Organellen entspricht
in hohem Masse derjenigen des Ausgangsmaterials (Abb. 3 b). Das in
der Blattzelle mit der Membran der Vakuole assoziierte elektronen-
dichte Material liegt hier allerdings in Form von runden Körpern im
Lumen des Organells vor (Pfeile), die beim Schneiden herausgebro-
chen sind; ihre Lage und Form ist durch die punktierte Linien mar-
kiert. Zudem treten im Cytoplasma grosse elektronendichte Granula
auf (gestrichelte Pfeile) (11'900x)

Abkürzungen: C, Chloroplast; K, Kern; M, Mitochondrium; V, Va-
kuole; PG, Plastoglobuli

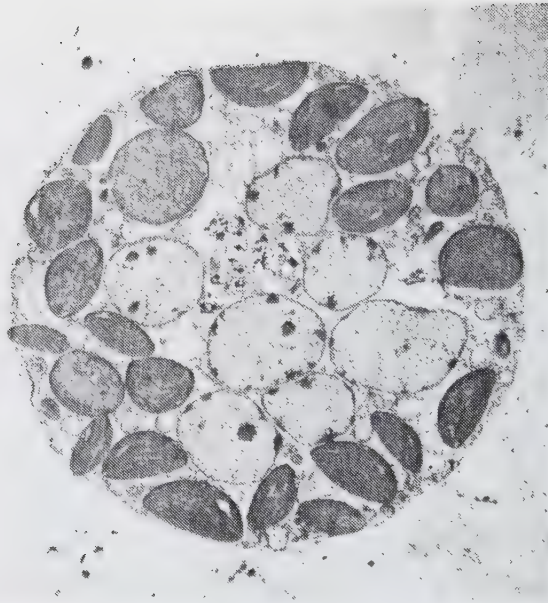
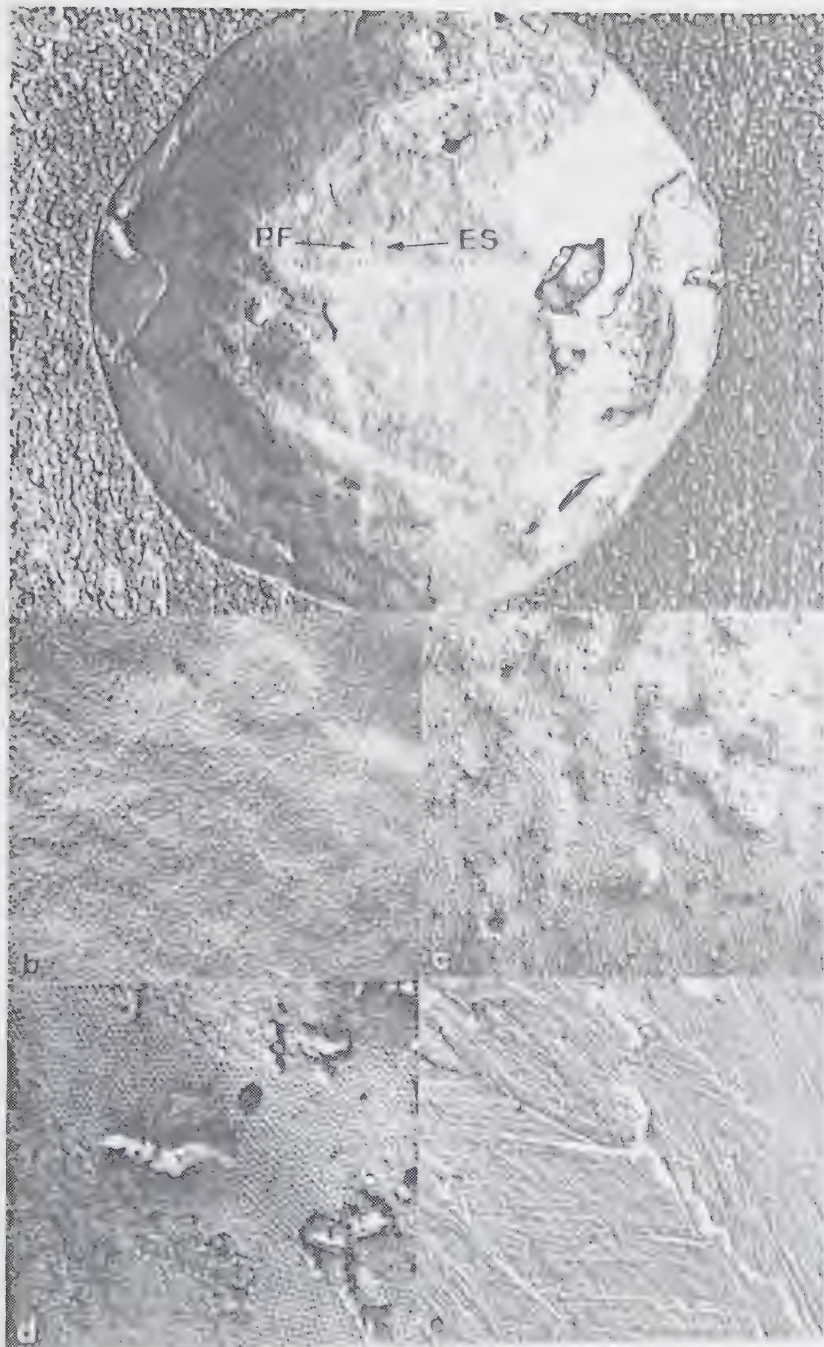


Abb. 6 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnittes durch einen Riesenprotoplasten von V. vinifera. Dieser enthält mindestens 7 Kerne sowie eine im Vergleich zum Normalprotoplasten (Abb. 5) erhöhte Anzahl von Chloroplasten und Mitochondrien. Das Objekt stellt demzufolge ein Fusionsprodukt mehrerer Individuen dar. (3500x)

Abb. 7 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Zellhülle von V. vinifera; Gefrierätzabdrücke: a - d, Protoplast; e, Mesophyllzelle

- a Protoplast, sowohl die ES*- als auch die PF*-Fläche exponierend (8'600x)
 - b Plasmalemmaoberfläche (ES); feinkörnig (44'900x)
 - c PF-Bruchfläche des Plasmalemmas; grobkörnig (23'500x)
 - d PF-Fläche mit Areal von Membranpartikeln, die in einem hexagonalen Muster angeordnet sind (47'200x)
 - e Tangentialer Bruch durch die Wand, Cellulosefibrillen (ca. 10 nm Durchmesser) sind ziemlich regelmässig angeordnet und verlaufen häufig in einem Winkel von 60° gegeneinander (34'200x)
- * Für die Nomenklatur vgl. Branton et al. (1975)



Die Vollständigkeit der Entfernung der Wand nach Einwirkung von Cellulase wurde mittels eines auf Cellulose spezifischen Tests gezeigt (Nagata und Takebe, 1970), trat doch nach Zugabe von Calcofluor White-M2R im Unterschied zu den nach kurzen Inkubationszeiten freigesetzten Sphäroplasten bei den Protoplasten keine UV-Fluoreszenz auf. Die ultrastrukturelle Analyse isolierter Protoplasten bestätigt diese Annahme, denn die Plasmamembran präsentiert sich vollkommen frei von Wandfragmenten und Fibrillen (Abb. 7 a). Die Plasmamembranoberfläche erscheint vorwiegend glatt (Abb. 7 b), während die PF-Bruchfläche (Branton et al., 1975) - die dann freigelegt wird, wenn der Gefrierbruch nicht entlang der Membran, sondern zwischen der Lipiddoppelschicht verläuft - mit kleinen Protuberanzen bespickt ist (Abb. 7 c). Gelegentlich konnten in der PF-Schicht Areale mit hexagonalem Muster beobachtet werden (Abb. 7 d), das den von Robenek und Peveling (1977) an *Skimmia*-, von Giddings et al. (1980) an Grünalgen- und von Müller und Brown (1980) an Mais- und Bohnenprotoplasten nachgewiesenen und übereinstimmend mit der Zellwand-Resynthese in Beziehung gebrachten Strukturen sehr ähnlich ist. Ein Vergleich dieses Musters mit der Textur der Sekundärwand aus Blättern von *V. vinifera* (Abb. 7 e) zeigt interessanterweise, dass die Cellulosefasern zueinander häufig in einem Winkel von ca. 60° stehen.

3. Vergleich der Fraktion der nichtflüchtigen organischen Säuren von Protoplasten mit derjenigen von Blattgewebe

Im Hinblick auf den Einsatz der Protoplastensuspensionen zu Untersuchungen stoffwechselphysiologischer Aktivitäten ist ausser der Vergleichbarkeit bezüglich der Struktur auch diejenige der Inhaltsstoffe unerlässlich.

3.1. Qualitative Zusammensetzung der Säurefraktion

Die Fraktion der organischen Säuren aus Blattgewebe und entsprechenden Protoplastenpräparationen wurde, wie im Kapitel II. 11. angegeben, extrahiert, aufbereitet und gaschromatographisch analysiert. Eine Gegenüberstellung der beiden Chromatogramme zeigt eine perfekte qualitative Übereinstimmung der betreffenden Extrakte (Abb. 8). Neben den Hauptkomponenten Wein- und Äpfelsäure konnten übereinstimmende, wenn auch kleinere Anteile an Phosphor- und Bernsteinsäure nachgewiesen werden. Das Auftreten eines Mannitgipfels im Protoplastenextrakt kann nicht überraschen, da der Zuckeralkohol als Osmotikum in 0,35 molarer Konzentration dem Cellulosemedium beigelegt wird und offenbar

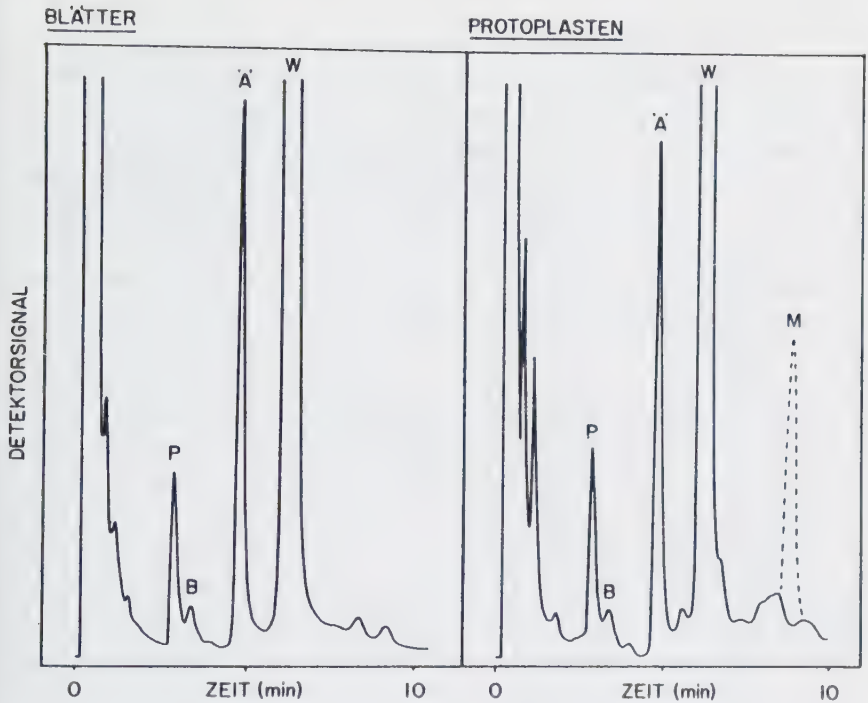


Abb. 8 Gaschromatographische Analysen von Trimethylsilylderivaten der Fraktion der organischen Säuren aus Rebenblättern und Protoplasten.
Abkürzungen: P, Phosphorsäure; B, Bernsteinsäure; A, Aepfelsäure; W, Weinsäure; (M, Mannit; vgl. Text)

im Waschzyklus nicht vollständig aus der Anionenaustauschersäule entfernt wird (Tanaka, 1981). Da die Hydroxylgruppen des Polyols bei der Derivatisierung der Säuren ebenfalls silyliert werden und das Produkt sowohl von der C-Kettenlänge als auch von den übrigen Charakteristika her den silylierten organischen Säuren weitgehend entspricht, ist eine Cochromatographie von Vertretern dieser beiden Substanzgruppen zu erwarten. Damit ist nachgewiesen, dass die Blattzellen während der Cellulaseinkubation keinen nennenswerten Veränderungen bezüglich der qualitativen Zusammensetzung ihrer Säurefraktion unterworfen sind. Zudem scheinen die Protoplasten die Zellen aus dem Ausgangsmaterial sogar hinsichtlich der quantitativen Verteilung der Säurefraktion zu repräsentieren.

3.2. Aepfelsäurekonzentration

Angesichts der bekannten Stoffwechselträchtigkeit von Weinsäure (Hardy, 1968; Saito und Kasai, 1968) galt unser Hauptinteresse der Aepfelsäure, die im Stoffwechselgeschehen der Weinrebe in jeder Beziehung eine zentrale Rolle zu spielen scheint. Andererseits ist die Kenntnis der Bildungs- wie auch der Abbauewege dieser Dikarbonsäure beschränkt auf die sie unmittelbar betreffenden Enzymreaktionen (Lakso und Kliewer, 1975 und 1978; Downton, 1977; Brem et al., (1981). Entferntere Stoffwechselschritte, die letztlich zur Synthese beziehungsweise zum Abbau dieser Verbindung führen, liegen, zumindest was die Verhältnisse bei C_3 -Pflanzen wie der Weinrebe betrifft, immer noch weitgehend im Dunkeln. Es zeigte sich denn auch bald, dass der Aepfelsäuregehalt innerhalb der Blattpopulation einer Anzuchtgruppe von Rebenstecklingen enormen Schwankungen unterworfen ist. Trotz Standardisierung der Extraktionsmethode, die sich durch ebenso hohe Genauigkeit wie Reproduzierbarkeit auszeichnet, und Verwendung von in Grösse und Aussehen gleichwertigen Blättern traten zwischen den Messresultaten Standardabweichungen im Bereich von 12 - 19 % auf. Da die Ursache dieser Schwankungen ursprünglich auf die Inhomogenität des Blattmaterials zurückzuführen ist, wurden Blätter dreigeteilt und diese Parallelproben einzeln untersucht. Der Umstand, dass sogar die Resultate dieser Messungen Abweichungen von 2 - 9 % ergaben, deutet an, dass auch Einzelblätter in Bezug auf die Aepfelsäureverteilung nicht einheitlich sind. Die Aepfelsäuregehalte in Protoplastensuspensionen streuten bedeutend weniger, nämlich lediglich um 1,5 - 2 %. Abb. 9 a zeigt, dass trotz der grossen Malatschwankungen im Ausgangsmaterial eine gewisse Korrelation zwischen dem Säuregehalt des Blattes und demjenigen der Protoplasten besteht. Als Basis für Berechnungen der Ausbeute dürfte die erhaltene Übereinstimmung aber nicht genügen. Auch Vergleiche des Chlorophyllgehalts in einer Reihe von Isolaten mit demjenigen des Gewebes zeigten lediglich eine lose Übereinstimmung zwischen Ausgangsmaterial und Protoplasten (Abb. 9 b), was darauf hinweist, dass nicht bestimmte Zelltypen, wie z.B. Vertreter der chlorophyllreichen Palisadenschicht, die Isolation besser überstehen. Um festzustellen, inwieweit der Aepfelsäuregehalt von Protoplasten Änderungen im Malatpegel der intakten Blätter reflektiert, wurde eine Aepfelsäureabnahme durch mehrtägige Dunkelhaltung der Pflanzen induziert (Pössner, pers. Mitt.) und der Malat- bzw. Chlorophyllgehalt von Protoplasten und Blättern in einer Messreihe verfolgt. Aus Abb. 10 geht hervor, dass die Chlorophyllmenge in beiden Systemen direkt nach dem Einbringen in die Dunkelheit etwas ansteigt, um später wieder etwa auf den Anfangswert abzusinken. Im Gegensatz dazu nahm die Aepfelsäurekonzentration im Dunkeln im Verlauf von 12 d

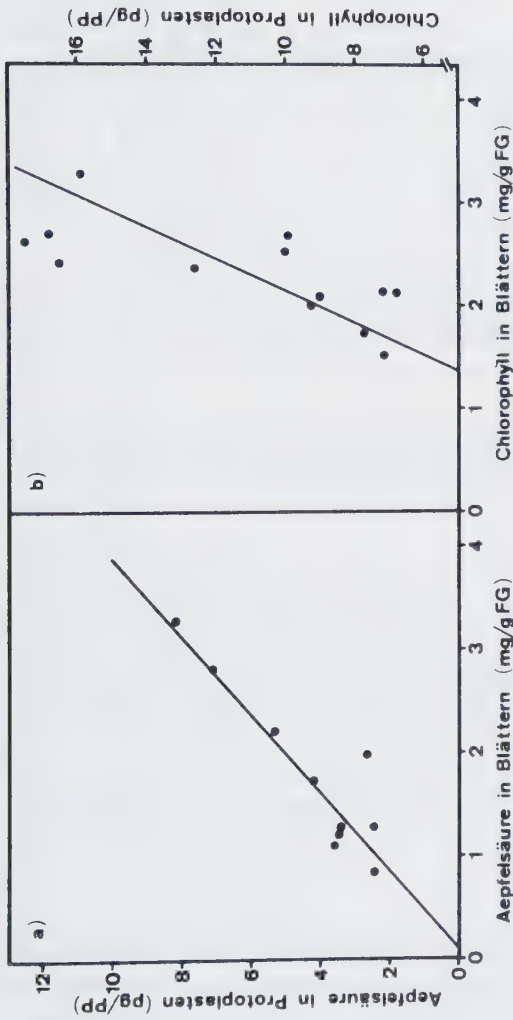


Abb. 9 a) Äpfelsäurekonzentration in Extrakten von Blättern bzw. ihnen entsprechenden Protoplasten
b) Chlorophyllgehalte von Blättern und zugehörigen Protoplastenisolaten

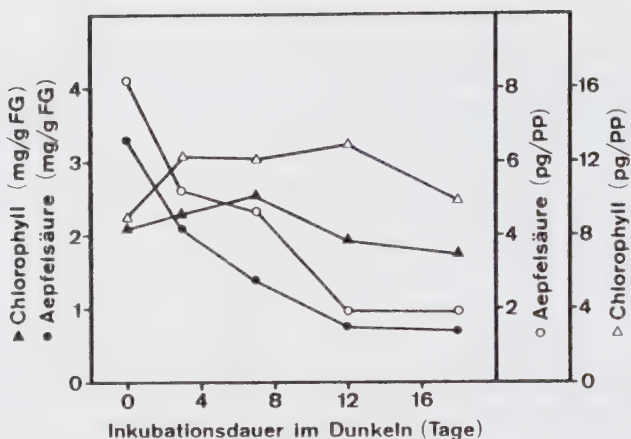


Abb. 10 Aepfelsäure- und Chlorophyllgehalt von Rebenblättern resp. daraus isolierten Protoplasten (PP) während mehrtägiger Dunkelhaltung (Man beachte die unterschiedlichen Skalen)

auf einen Minimumswert ab, der sich auch nach einer weiteren Woche ohne Beleuchtung nicht mehr verringerte. Blätter und Protoplastensuspensionen zeigten in diesem Fall eine sehr gute Übereinstimmung bezüglich des Konzentrationsverlaufs der Aepfelsäure. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass andauernde Dunkelheit zu einer Abnahme des Aepfelsäurepegels führt.

4. Beeinflussung stoffwechselphysiologischer Aktivitäten der Protoplasten durch exogene Faktoren

4.1. Aepfelsäuremetabolismus

Um Einblick in die Stoffwechselbilanz der Aepfelsäure von Rebenprotoplasten zu erhalten, wurde jeweils die Malatkonzentration in den Suspensionen vor und nach fünfstündiger Inkubation unter variablen Aussenbedingungen (Licht, pH, Bikarbonatgehalt) bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass ohne pH-Anpassung und ohne exogenes NaHCO_3 eine Tendenz zur Verminderung des Aepfelsäuregehaltes besteht, die allerdings in Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen und von der Anfangskonzentration des Malats verschieden stark ausgeprägt ist.

Tab. 3: Abnahme der Aepfelsäure in Protoplasten bei Inkubation im Licht und im Dunkeln in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration.

Malatkonzentration vor der Inkubation	Malatgehalt nach der Inkubation	Malatgehalt nach der Inkubation
(pg/Protoplast)	(% der Anfangskonz.)	(% der Anfangskonz.)
	hell	dunkel
4,2	28	17
1,8	49	15

Wie Tab. 3 zeigt, wurde eine maximale Abnahme der Aepfelsäure um 85 % im Verlauf von fünf h bei Aufbewahrung der Suspensionen in cellulasefreiem Isolationsmedium (pH 5,7) unter Lichtausschluss festgestellt, währenddem bei Beleuchtung der Ansätze je nach Anfangskonzentration Abnahmen zwischen 50 und 70 % auftraten.

Da Böcher und Kluge (1977 und 1978) nach Inkubation von Spinatblattstreifen eine Abhängigkeit des Malatgehalts vom pH-Wert des Suspensionsmediums, nämlich einen Abbau im sauren Milieu bzw. eine Akkumulation unter neutralen Bedingungen beobachtet hatten, wurden im folgenden gepufferte Protoplastensuspensionen im interessierenden pH-Bereich von 5,5 - 8 im Licht bzw. im Dunkeln inkubiert und die resultierenden Malatkonzentrationen mit dem Anfangswert verglichen. Aus den in Abb. 11 dargestellten Mittelwerten aus fünf Versuchen geht hervor, dass der Malatgehalt von Protoplasten mit sinkenden pH-Werten bis zum pH 6 ebenfalls abnimmt, währenddem beim tiefsten Wert jeweils eine leicht höhere Aepfelsäurekonzentration gemessen wurde. Auch hier liegt jedoch die Säurebilanz der im Dunkeln gehaltenen Suspensionen deutlich unter dem Hellwert. Eine effektive Zunahme des Malatgehalts konnte in dieser Versuchsreihe lediglich bei pH 8 und Inkubation im Licht nachgewiesen werden. Es stellte sich nun die Frage, ob die bei pH 6 ein Minimum durchlaufenden Bilanzkurven möglicherweise das Resultat der bei diesen pH-Werten in wechselnden Anteilen vorliegenden Alkaliionen sein könnten. Um den Einfluss der Kationenspezies auf den Malatstoffwechsel zu überprüfen, wurden zu Vergleichszwecken dem Soerensen-Puffer entweder mit NaOH oder KOH eingestellte Phosphat- bzw. Morpholinoäthansulfonatlösungen gegenübergestellt: Na/K-Phosphat (Soerensen), Na-Phosphat, K-Phosphat, MES-NaOH, MES-KOH (0,1 M; pH 5 - 7,5).

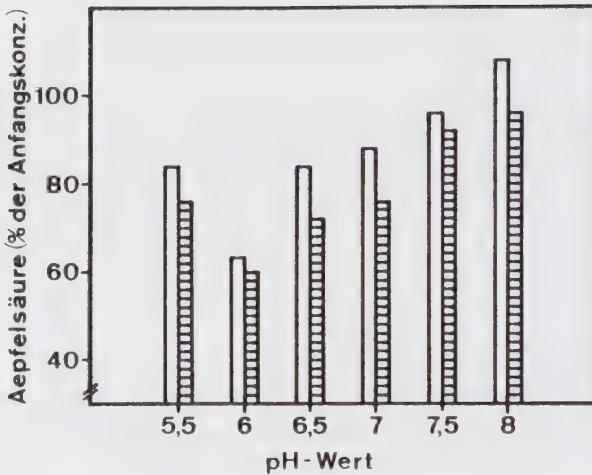


Abb. 11 Aepfelsäuregehalt von Protoplasten nach fünfstündiger Inkubation in 0,1 M Na/K-Phosphat-Puffer (nach Soerensen)  im Licht und  im Dunkeln

Aus den in Abb. 12 zusammengefassten Resultaten ist ersichtlich, dass die Minimumskurve sich auch unter diesen Bedingungen reproduzieren lässt und somit weder auf den Einfluss des Phosphats noch auf einen allfälligen Ionenantagonismus zurückgeführt werden kann. Die relativ hohe Streuung in den unteren pH-Bereichen beruht auf den in der vorliegenden Reihe extrem tiefen Aepfelsäurekonzentrationen, die an die Empfindlichkeitsgrenze der verwendeten Messmethode stossen. Um generell den Einfluss einwertiger Kationen auf den Abbau der Säure abzuklären, wurden in einem folgenden Ansatz die bereits oben beschriebenen Puffersysteme anstatt mit Natron- bzw. Kalilauge mit wässrigem Tetramethylanmoniumhydroxid (TMAH), einer mineralionenfreien Base, eingestellt. Grundsätzlich manifestieren sich aber auch in diesen Puffergemischen dieselben Tendenzen, wobei aber eine parallele Verschiebung der prozentualen Werte nach oben beobachtet wurde. Da das gleiche Phänomen aber auch bei der analog mitgeführten Soerensen-Pufferreihe auftrat, muss diesem Unterschied wohl ein allgemeiner Trend zur Synthese von Aepfelsäure in den betreffenden Protoplastensuspensionen bzw. auch im verwendeten Ausgangsmaterial zugrunde liegen (Abb. 13). Dies lässt vermuten, dass doch der pH-Wert des Inkubationsmediums direkt

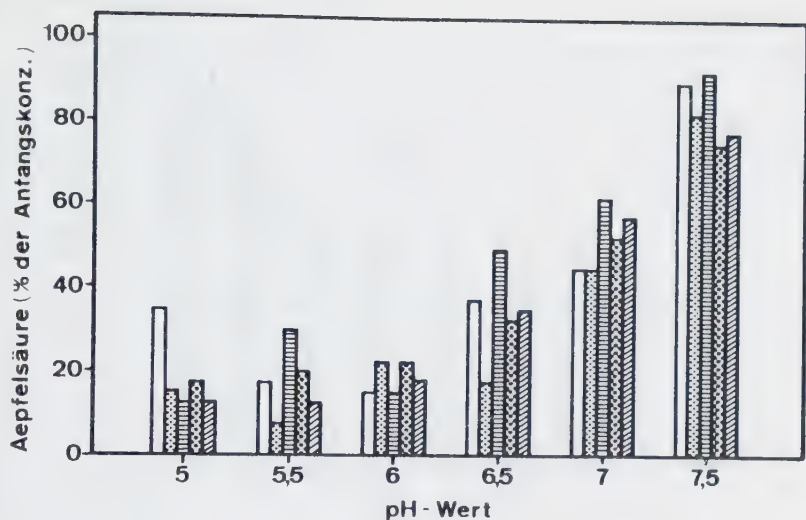


Abb. 12 Aepfelsäuregehalt von Protoplasten nach Inkubation in verschiedenen Puffersystemen: □ Phosphat nach Soerensen, ▨ Phosphat-NaOH, ▤ Phosphat-KOH, ▩ MES-NaOH, ▪ MES-KOH (MES = Morpholinoäthansulfonsäure)

oder indirekt einen wesentlichen Einfluss auf den Malatmetabolismus ausübt.

Da allgemein die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat als, wenn vielleicht auch nicht geschwindigkeitsbestimmende, Schlüsselreaktion zur Bildung von Aepfelsäure via Oxalacetat angesehen wird (Lakso und Kliever, 1975), wurde im folgenden die Wirkung von zusätzlichen Bikarbonatgaben auf das Abbau/Synthese-Gleichgewicht untersucht. Dabei beschränkte sich die Dosierung des Bikarbonats zwangsläufig auf den Bereich zwischen 0 und 10 mMol/l, da andernfalls die Pufferkapazität des verwendeten Puffers (Soerensen, 0,1 M) überschritten wird und damit die Erhaltung des gewünschten pH-Werts nicht mehr gewährleistet ist. Aus Abb. 14 geht hervor, dass bei einem pH-Wert von 6, d.h. im Bereich, in dem normalerweise eine maximale Malatabnahme festgestellt worden war, die stufenweise Erhöhung der Bikarbonatkonzentration zu augenfälligen Unterschieden in der Malat-Endkonzentration führt. Offensichtlich wirkt ein Zusatzangebot von NaHCO_3 nur unter pH-Bedingungen stimulierend, bei welchen in Abhängigkeit von der Titrationskurve ein relativ grosser Anteil als

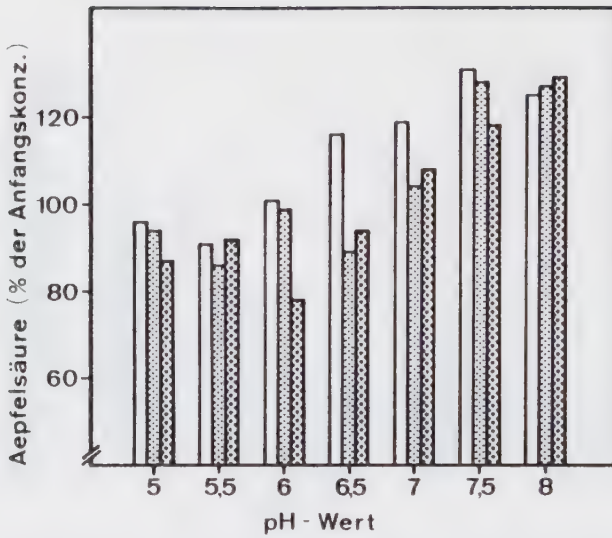


Abb. 13 Aepfelsäuregehalt von Protoplasten nach Inkubation in Pufferlösungen mit und ohne mineralische Kationen: □ Na/K-Phosphat nach Soerensen, ▤ Phosphorsäure mit Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH), ▨ Morpholinoäthansulfonsäure (MES) mit TMAH.

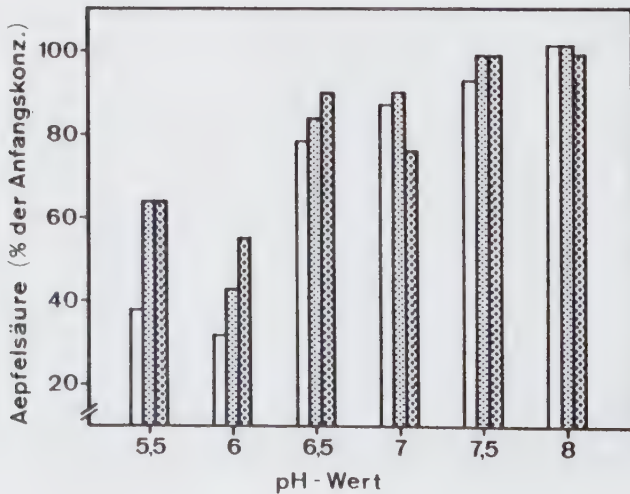


Abb. 14

CO₂ vorliegt, während im neutralen und leicht alkalischen Bereich genügend gelöstes Bikarbonat vorhanden ist und bei diesen Inkubationsbedingungen nicht als limitierender Faktor auftritt. Demzufolge ist anzunehmen, dass der CO₂-akzeptierende C₃-Körper für die Malatsynthese in suboptimaler Menge vorliegt. Da die betreffende chemische Verbindung, Phosphoenolpyruvat, bekanntlich über den glykolytischen Abbau von Hexose angeliefert wird (Böcher und Kluge, 1977 und 1978; Brem et al., 1981), versuchte man, die Bildung von Aepfelsäure durch Zugabe von Glucose zu stimulieren.

Tab. 4: Aepfelsäuregehalt von Protoplastensuspensionen in % der Anfangskonzentration nach Applikation von Glucose (5 mM) bei verschiedenen pH-Werten.

	Kontrolle	+ Glucose
	(%)	(%)
pH 5,5	101	98,5
pH 7,5	110	112

Wie Tab. 4 zeigt, brachte ein Zusatz von Glucose unter den gegebenen Verhältnissen keine messbare Steigerung des Malatgehalts. In einer Wiederholung des Versuchs wurde, um eine Beeinflussung des Stoffwechsels durch die Verfügbarkeit von Zucker im allgemeinen zu untersuchen, neben der Glucose auch radioaktives Bikarbonat im Licht und im Dunkeln appliziert. Die quantitativen Inkorporationsunterschiede sind, wie aus Tab. 5 ersichtlich ist, sehr gering, obwohl im Licht wie auch im Dunkeln Glucosesupplementierung eine Tendenz zur Erhöhung des ¹⁴C-Totaleinbaus bewirkte.

Abb. 14 Aepfelsäuregehalt von Protoplasten nach Inkubation in Soerensen-Puffer mit zusätzlichen Bikarbonat-Gaben: □ 0 mM, ▒ 5 mM, ▓ 10 mM

Tab. 5: Einbau von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ in Protoplasten mit und ohne Zugabe von Glucose (5 mM) zum Inkubationsmedium im Licht und im Dunkeln.

Lichtverhältnisse	Supplement	Einbau (% des Tracers)
hell	-	16,6
hell	Glucose	17,8
dunkel	-	0,4
dunkel	Glucose	0,5

Dünnschichtchromatographische Auftrennungen der Extrakte aus den beleuchteten Suspensionen ergaben einzig bei Fructose, Citrat und Malat eine auf die Glucosegabe zurückführbare, wenn auch geringe Aktivitätserhöhung (Tab. 6). Bei den Dunkelansätzen muss wegen der äusserst geringen Einbaurrate auf quantitative Angaben verzichtet werden. Es stellt sich nun die Frage, ob Glucose überhaupt ins Zellinnere gelangen und somit in den Stoffwechsel einbezogen werden konnte. Bei der experimentellen Bearbeitung dieses Problems mittels radioaktiver Glucose ergibt sich die Schwierigkeit, dass die Protoplasten nach der Inkubation von der Tracersubstanz gereinigt werden müssen, wozu mindestens eine Zentrifugation mit nachfolgender Resuspension in tracerfreiem Medium erforderlich wäre. Dies würde aber eine Verfälschung der Bezugsgrösse durch nicht sedimentierende und platzende Individuen mit sich bringen. Wenn man die Reinigung aus diesem Grund auf ein einmaliges, möglichst vollständiges Absaugen der Inkubationslösung beschränkte, konnte nach Abzug der dem Tracer zugeordneten Radioaktivität lediglich eine sehr geringe ^{14}C -Aufnahme festgestellt werden. Genauere Analysen liessen aber die Bildung kleiner Mengen von radioaktivem Malat, Citrat, Glutaminsäure und Saccharose erkennen. Durch Angebot von ATP wurde versucht, allfälligen Energieansprüchen eines Zuckereinhaus Rechnung zu tragen. Die prozentualen Inkorporationsraten von $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Glucose bewegten sich aber mit und ohne Nucleotidzusatz in vergleichbarem Rahmen, wobei unter Lichtausschluss doch ein Trend zur Erhöhung des Einbaus durch ATP festgestellt werden konnte.

Phosphoenolpyruvat als unmittelbarer C_3 -Präkursor von Malat permeiert bekanntlich intakte Biomembranen aufgrund seiner Polarität nur schlecht, weshalb das C_3 -Körper-Angebot auf die Zugabe von $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Serin beschränkt wurde, welches von Kent et al., (1974) und Kent (1979) wegen der in Malat gefundenen, vergleichbaren intramolekularen Radioaktivitätsverteilung ebenfalls als unmittelbarer Präkursor von Äpfelsäure ins Auge gefasst wurde. Tatsächlich wurde auch

Tab. 6: Verteilung der Radioaktivität in Protoplastenextrakten nach Applikation von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (12,5 mM) mit und ohne Zugabe von nicht radioaktiver Glucose (5 mM).

	Kontrolle	+ Glucose
	(%)	(%)
Zucker	51,6	50,0
Aminosäuren	19,4	18,6
Organische Säuren	9,0	9,6
Fructose	13,0	14,5
Glucose	13,2	15,6
Maltose	9,6	8,4
Saccharose	15,8	11,5
Alanin	6,3	6,0
Asparaginsäure	1,8	1,6
Glutaminsäure	8,3	7,4
Serin	0,6	0,7
Aepfelsäure	7,7	8,0
Zitronensäure	1,3	1,6
Nicht identif.	9,6	8,3
Wiedergef. Akt.*	86,8	84,2

* Die Chromatographie wurde im Durchlaufverfahren ausgeführt, was zum Verlust einzelner Substanzen mit hoher Laufgeschwindigkeit führt.

bei Angebot von radioaktivem Serin an Mesophyllzellen von Chenopodium album (Baumann und Günther, 1980) die Aminosäure als relativ guter Präkursor der organischen Säuren und insbesondere Malat nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde ^{14}C -Serin von den Rebenprotoplasten nur in geringem Masse aufgenommen und vergleichbare Radioaktivitätsanteile konnten - zum mindesten in Licht - ausser im Malat und in den Aminosäuren Alanin, Asparagin- und Glutaminsäure ebenfalls in Saccharose nachgewiesen werden, was doch einen gerichteten Stoffwechselweg Serin-Aepfelsäure im untersuchten Material wenig wahrscheinlich werden lässt.

4.2. CO₂-Fixierung

Während bei Versuchen mit nicht radioaktivem Bikarbonat (Abb. 14) wohl die Veränderungen in Bezug auf die Malatkonzentrationen bilanzmässig erfasst werden können, lassen sich aber keine Aussagen über die Stoffwechselherkunft bzw. den Bildungsweg der Aepfelsäure machen. Um dieser Frage nachzugehen, wurde im folgenden NaH¹⁴CO₃ bei pH 6 und 7,5 sowohl im Licht als auch im Dunkeln angeboten, also bei Bedingungen, welche erfahrungsgemäss zu wesentlichen Unterschieden im Stoffwechsellmuster führen (Abb. 15). Tatsächlich manifestiert sich der Einfluss dieses Milieuwechsels bereits deutlich in der unterschiedlichen Inkorporation von radioaktivem Kohlenstoff in die säurestabile Fraktion der Protoplastensuspensionen (Tab. 7).

Tab. 7: Einbau von NaH¹⁴CO₃ in die säurestabile Fraktion von Protoplasten bei unterschiedlichen Licht- und pH-Bedingungen.

	hell		dunkel	
	(dpm/µg Chl)	in Prozent des Tracerangebots	(dpm/µg Chl)	in Prozent des Tracerangebots
pH 6	2251	2,6	276	0,3
pH 7,5	12940	13,2	1274	1,3

Bei beiden pH-Werten betrug die Aufnahme im Licht etwa das zehnfache der Dunkelinkorporation, wobei im neutralen Bereich jeweils ein ca. fünfmal höherer Einbau als im leicht sauren Milieu gemessen werden konnte. Dass es sich dabei nicht nur um eine quantitativ unterschiedliche Aufnahme von ¹⁴CO₂ unter variierenden Bedingungen handelt, kann der in Tab. 8 dargestellten Markierungsverteilung auf die verschiedenen Substanzgruppen entnommen werden. Die aufgeführten Resultate zeigen ausserdem, dass die Inkorporationsunterschiede im allgemeinen weniger einzelne Verbindungen als vielmehr ganze Stoffklassen betreffen. So wird im Licht unabhängig von pH-Wert eindeutig der Grossteil der ¹⁴C-Aktivität in die Zuckerfraktion eingebaut, während die Synthese der beiden Krebszyklussäuren - Malat und Citrat - im Dunkeln erwartungsgemäss intensiviert wurde, was sich in einer Erhöhung der Inkorporationsrate um etwa den Faktor zwei ausdrückt. Ebenfalls höhere Einbauwerte im Dunkeln weisen die Aminosäuren auf, wobei in diesem Fall offen bleibt, ob die pH-bedingten Unterschiede im Hellen auf eine Aktivierung der Synthese in sauren Bereich oder auf eine entsprechende Hemmung im neutralen Milieu zurückgeführt werden müssen.

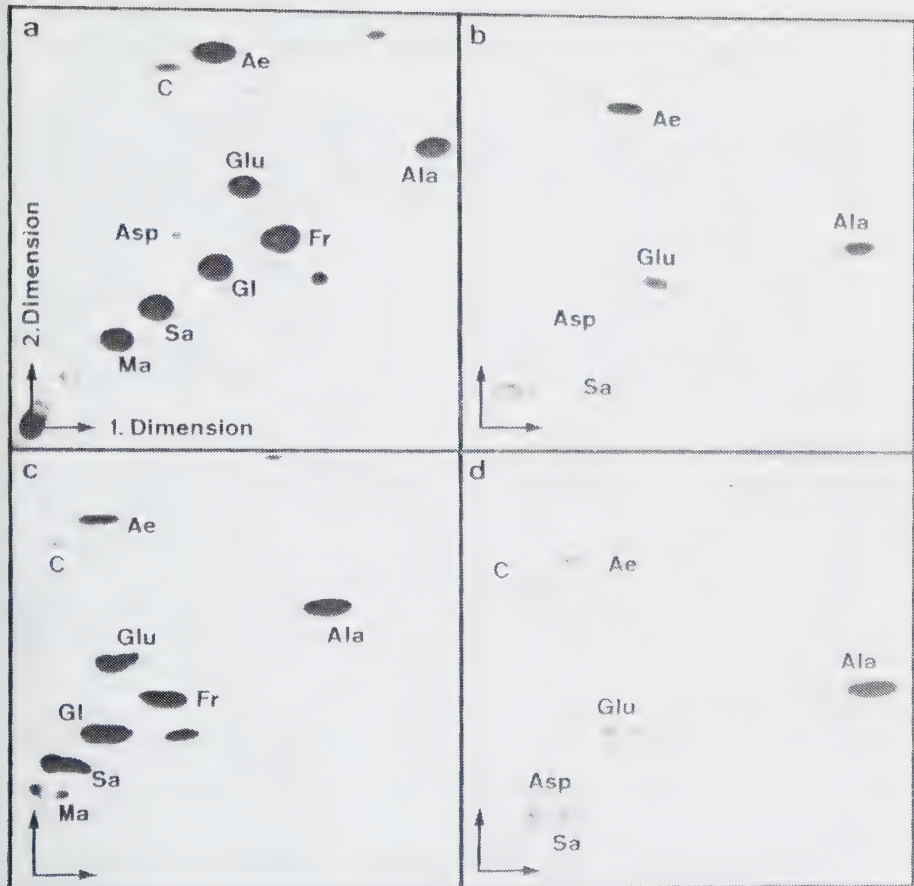


Abb. 15 Dünnschichtchromatographische Trennung von markierten Stoffwechselprodukten nach Applikation von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ an Protoplastensuspensionen während 5 Std. unter verschiedenen Licht- und pH-Verhältnissen.
a pH 7,5 hell; b pH 7,5 dunkel; c pH 6 hell; d pH 6 dunkel
Abkürzungen: Ae, Aepfelsäure; Ala, Alanin; Asp, Asparaginsäure; C, Zitronensäure; Fr, Fructose; Gl, Glucose; Glu, Glutaminsäure; Ma, Maltose; Sa, Saccharose

Tab. 8: Radioaktivitätsverteilung in Prozent der Aktivität im Extrakt nach Applikation von ^{14}C -Bikarbonat an Protoplasten unter verschiedenen Licht- und pH-Bedingungen.

	pH 7,5		pH 6	
	hell	dunkel	hell	dunkel
	(%)	(%)	(%)	(%)
Zucker	46,5	15,6	42,2	8,9
Aminosäuren	17,2	39,0	29,6	42,8
Organische Säuren	8,3	15,6	5,7	14,2
Fructose	9,1	2,2	12,2	2,8
Glucose	8,8	1,7	12,3	2,1
Maltose	7,1	2,7	3,2	+
Saccharose	21,5	9,0	14,5	4,0
Alanin	3,5	13,6	14,1	23,6
Asparaginsäure	2,5	3,6	1,5	2,8
Glutaminsäure	8,3	16,2	8,9	10,4
Serin	2,9	5,6	5,1	6,0
Äpfelsäure	6,9	13,6	4,3	10,3
Zitronensäure	1,4	2,0	1,4	3,9
Nicht identif.	7,0	8,5	5,8	10,8
Wiedergef. Akt.*	79,0	78,7	83,3	76,7

* Die Chromatographie wurde im Durchlaufverfahren ausgeführt, was zum Verlust einzelner Substanzen mit hoher Laufgeschwindigkeit führt.

Da einerseits zumindest bei pH 6 das Angebot an gelöst vorliegendem Bikarbonat bzw. CO_2 einen wesentlichen Einfluss auf die Malatbilanz auszuüben scheint und andererseits bei Assimilationsversuchen die Gaszusammensetzung der Luft steuernd auf das Stoffwechselschicksal des neufixierten Kohlenstoffs wirkt, wurde das Suspensionsmedium für die folgenden Experimente mit verschiedenen Gasen bzw. Gasgemischen durchlüftet und damit einheitliche Verhältnisse geschaffen. Unmittelbar vor Versuchsbeginn vervollständigte man die vorbehandelten Medien durch Beifügen von 12,5 mM ^{14}C -Bikarbonat und schliesslich Zugabe von gereinigten Protoplasten. Auch diese Testreihen wurden bei zwei verschiedenen pH-Werten angesetzt. Wie aus Tab. 9 hervorgeht, zeigten sich auch in diesem Fall

Tab. 9: Einbau von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ in Abhängigkeit von pH-Wert durch Rebenprotoplasten nach Anreicherung des Inkubationsmediums mit verschiedenen Gasen.

Gas	pH 6		pH 7,5	
	dpm/ μg Chl.	% des Tracer-angebots	dpm/ μg Chl.	% des Tracer-angebots
Kontrolle	1645	0,9	12266	6,5
O_2	890	0,5	8976	4,7
N_2	2358	1,2	14042	7,4
Luft	2020	1,1	7529	4,0
CO_2 -freie Luft	1726	0,9	8023	4,2

die Protoplastensuspensionen bei pH 7,5 assimilatorisch bedeutend aktiver, wobei insbesondere nach Vorbehandlung mit Stickstoff die höchsten ^{14}C -Einbauraten erreicht wurden. Die Aktivierung kann aber nicht lediglich auf eine durch Entfernen des in der Lösung bereits vorhandenen, inaktiven Bikarbonats und der damit verbundenen Erhöhung der spezifischen Aktivität des Tracers zurückgeführt werden, da andererseits ein Durchgasen mit Sauerstoff eine deutliche Verminderung der ^{14}C -Inkorporation zur Folge hatte. Diese Effekte traten ebenfalls bei leicht saurem pH auf, währenddem nach Durchgasen mit Luft im neutralen Bereich eine Hemmung, bei pH 6 aber eher eine Erhöhung des ^{14}C -Einbaus resultierte. Die quantitative Auswertung der dünn-schichtchromatographisch getrennten Extrakte (Tab. 10) zeigt, dass die durch den pH-Sprung hervorgerufenen Unterschiede weit deutlicher sind als die Differenzen, welche auf die Vorbehandlung zurückzuführen sind. Als Ausnahme muss hier vielleicht die nach O_2 -Begasung auftretende, erhöhte relative Radioaktivität in den Krebszyklus-komponenten Äpfelsäure und Zitronensäure sowie der metabolisch nahe verwandten Asparaginsäure erwähnt werden. Die übrigen Tendenzen stimmen mit den in Tab. 8 aufgeführten Werten weitgehend überein. Die Variabilität der ^{14}C -Einbauraten (Tab. 9) ist damit rein quantitativer Natur und demzufolge nicht auf die Konkurrenzrelation zwischen oxidativem und reduktivem Kohlenstoffmetabolismus zurückzuführen, welche bei O_2 -Anreicherung im intakten Rebenblatt für eine ausgeprägte Verschiebung des Einbaumusters in Richtung Photorespiration verantwortlich ist (Malipiero et al., 1981).

Tab. 10: ^{14}C -Verteilung in Prozent der Totalaktivität des Protoplastenextrakts bei Applikation von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ nach verschiedener Begasung des Inkubationsmediums.

	pH 6					pH 7,5				
	Kontr.	O_2	N_2	Luft	CO_2 -fr. Luft	Kontr.	O_2	N_2	Luft	CO_2 -fr. Luft
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Zucker	39,6	30,6	37,0	40,7	36,4	52,0	44,2	48,5	45,5	46,7
Aminosäuren	25,7	23,4	22,6	24,9	26,1	14,2	16,9	12,6	14,1	13,5
Organische Säuren	6,1	8,2	4,9	5,9	6,1	9,4	12,8	9,6	9,1	8,4
Fructose	12,9	10,6	16,8	18,9	14,6	10,1	7,9	9,5	8,9	9,6
Glucose	14,4	10,9	16,4	19,1	13,8	10,2	8,3	9,5	10,0	10,7
Maltose	3,2	2,6	2,4	2,3	2,3	9,0	5,9	12,3	9,0	9,2
Saccharose	9,1	6,5	1,4	0,4	5,7	22,7	22,1	17,2	17,6	17,2
Alanin	15,0	14,3	13,5	15,8	15,8	4,0	5,3	3,0	4,3	4,1
Asparaginsäure	0,6	1,1	0,4	0,5	1,1	2,2	2,5	2,0	1,6	1,6
Glutaminsäure	10,1	8,8	8,7	8,6	9,2	7,4	8,1	7,0	7,4	7,1
Serin	-	-	-	-	-	0,6	1,0	0,6	0,8	0,7
Äpfelsäure	4,3	4,1	3,1	4,0	3,9	7,8	10,2	7,8	7,8	7,0
Zitronensäure	1,8	4,1	1,8	1,9	2,2	1,6	2,6	1,2	1,3	1,4
Nicht identif.	12,9	14,6	11,9	14,6	14,6	10,8	11,3	9,9	8,6	9,1
Wiedergef. Akt.*	84,3	77,6	76,4	86,1	83,2	86,4	85,2	80,0	77,3	77,7

* Die Chromatographie wurde im Durchlaufverfahren ausgeführt, was zum Verlust von Substanzen mit hoher Laufgeschwindigkeit führt.

I V . D I S K U S S I O N

Im Hinblick auf die Einsatzmöglichkeiten von Protoplastensuspensionen in der experimentellen Forschung, insbesondere deren Verwendung als System zum Studium des Aepfelsäurestoffwechsels in C_3 -Pflanzen (vgl. Einleitung), wurden Versuche zur Isolation nackter Zellen aus dem Rebenblatt unternommen, wenn auch dieses wegen der hohen Konzentration an phenolischen Substanzen und Azidität des Zellsaftes als ein hierfür eigentlich nicht besonders geeignetes Ausgangsmaterial zu betrachten war. Andererseits ist eine Abklärung der Aepfelsäurebildung bei der Weinrebe in Anbetracht der mit dieser Komponente eng korrelierten Qualitätsmerkmale der Frucht von primärem Interesse, das einen Versuch, selbst wenn nur ein Teilerfolg resultieren sollte, als lohnend erscheinen liess. Da als Folge der vielfältigen Verwendungszwecke von Protoplastenisolaten die Wertungskriterien, was Gelingen oder Fehlschlag betrifft, sehr variabel sind und zu- meist nur im Rahmen eines bestimmten Anforderungsprofils präzise formuliert werden können, soll im folgenden die Beurteilung der Ergebnisse entsprechend den vorgegebenen Zwischenzielen - Isolation und Erhaltung der Lebensfähigkeit; strukturelle und inhaltliche Repräsentation des Muttergewebes; Untersuchung der physiologischen Reaktionen - gesondert erfolgen.

1. Isolation und Vitalität der Protoplasten

Erste Ansätze zur Isolation von Protoplasten aus dem Rebenblatt bestätigten die geäusserten Vorbehalte bezüglich dessen Eignung als Ausgangsmaterial, indem - allerdings ohne dass bereits prophylaktisch Gegenmassnahmen ergriffen worden wären - der enzymatische Wandabbau empfindlich gestört wurde. Durch Adaptation der für ähnliche Fälle ausgearbeiteten Schutzmassnahmen (Loomis, 1974; van Sumere et al., 1975), nämlich Beigabe eines reduktiven Agens und von Polyäthylenglycol zur Verhinderung der Bildung von enzymhemmenden Protein-Gerbsäurekomplexen (Goldstein und Swain, 1965; Hawker, 1969) sowie sorgfältige Auswahl der Cellulasepräparation (vgl. Einleitung zu III), konnte schliesslich ein Verfahren gefunden werden, das selbst beim Rebenblatt normalerweise eine Protoplastenisolation erlaubt. Es zeigte sich allerdings, dass für einen erfolgreichen Wandabbau neben den Inkubationsbedingungen auch der Zustand des Ausgangsmaterials von entscheidender Bedeutung ist. So verunmöglichen hohe Lichtintensitäten und/oder Temperaturen bei der Anzucht der Stecklinge eine Protoplastenisolation, und die Ausbeute ist stark vom Alter der Blätter abhängig, wobei insbesondere ganz junge und alternde Blätter sich als ungeeignet erwiesen (III.1.1.).

In allen Fällen bleibt unklar, ob Veränderungen an der eigentlichen Wandstruktur (Cassels und Barlass, 1976) als Ursache für diese Unterschiede zu betrachten sind, oder ob eine verstärkte Bildung von cellulasehemmenden Substanzen dafür verantwortlich ist.

Als Hauptkriterium für den Erfolg einer Protoplastenisolation wird also im vorliegenden Fall die vollständige Entfernung der Zellwand gewertet (vgl. Einleitung), wobei bereits das Auftreten der Zyklose (Abb. 2 a) als sicheres Zeichen dafür gelten kann, dass der Protoplast nicht mehr von einer starren Cellulosestruktur umgeben ist. Tatsächlich verlief der entsprechende Calcofluor-test durchwegs negativ. Da nach Cellulasebehandlung von Tomaten-Fruchtfleisch noch Protoplasten mit anhaftenden Fibrillenresten gefunden worden sind (Pojnar et al., 1967; Willison und Cocking, 1972) und die genügende Empfindlichkeit dieser Färbemethode überhaupt in Frage gestellt worden ist (Williamson et al., 1977), galt bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Isolate ein besonderes Augenmerk diesem Punkt. Wie durch Abb. 7 a und b belegt wird, enthalten die hier untersuchten Protoplastenpräparationen keine Sphäroplasten, wie dies auch nach Anwendung der gleichen Methode bei Isolaten aus Convolvulus und Skimmia zutrifft (Horine und Ruesink, 1972; Robenek und Peveling, 1977). Die Tatsache, dass die isolierten Protoplasten Zyklose zeigen, weist ferner auf die Integrität der Plasmamembran als physiologische Barriere hin, denn ein Verlust der damit kausal verbundenen Semipermeabilität müsste ja unweigerlich zum Kollaps des Protoplasten führen. Diese Argumentation wird gestützt durch die positiven Ergebnisse der diesbezüglichen zellphysiologischen Tests, insbesondere den Ausschluss von Trypanblau, die selektive Aufnahme von Fluorescein ins Cytoplasma sowie die Akkumulation von Neutralrot in der Vakuole (Abb 2 b-d). Der Trypanblautest wurde routinemässig jeweils nach fünf Stunden, d.h. am Ende der für die Stoffwechseluntersuchungen eingeräumten Zeitdauer, durchgeführt. Nach Inkubationsperioden von mehr als 20 Stunden wurde dann allerdings eine Tendenz zur Agglutination einzelner Individuen sowie zur einseitigen Kontraktion des Cytoplasmas festgestellt (Abb. 2 a, Pfeil). Solche polarisierten Protoplasten eignen sich nach Buser und Matile (1977) am besten für die Isolation von Vakuolen, was einen zusätzlichen Hinweis auf eine gewisse Beeinträchtigung der Robustizität des Plasmalemmas darstellen könnte.

Für die Repräsentativität der Protoplasten für das Ausgangsmaterial bezüglich der Photosyntheseleistung vgl. Abschnitt III.4.2. und IV.3.

2. Charakterisierung von Struktur und Inhalt der Protoplasten im Vergleich mit dem Ausgangsmaterial

Detaillierte Informationen über die Struktur der isolierten Protoplasten können letztlich einzig elektronenoptische Untersuchungen liefern, wie sie ja bereits unter IV.1. zur Entscheidung bezüglich der Persistenz von Cellulosefasern beigezogen wurden. Aus den in Abb. 3 b und 5 gezeigten Resultaten geht eindeutig hervor, dass die isolierten Individuen in struktureller Hinsicht den Vertretern im intakten Gewebe durchaus entsprechen, da keine auf den Isolationsprozess zurückführbaren Aberrationen in der Lage, Anzahl oder Struktur der Zellorganellen gefunden werden konnten. Den wesentlichsten Unterschied zwischen den 'nackten' Zellen und den noch im Gewebeverband befindlichen bilden die sog. 'osmiophilic bodies' (Taylor und Hall, 1978) im Cytoplasma der Protoplasten. Sie scheinen ihren Ursprung in den für Mesophyllzellen physiologisch doch als ungünstig zu wertenden Isolationsbedingungen, insbesondere in einem durch die notwendige Hypertonie des Inkubationsmediums bedingten Wassermangel zu haben (Gigot et al., 1975; Prat, 1972). Für diese Interpretation spricht die Tatsache, dass die Ausbildung sehr ähnlicher oder identischer Symptome durch Inkubation von Tabak-Blattmaterial in hypertonischen Lösungen auch in intaktem Gewebe induziert werden konnte (Taylor und Hall, 1978). Dieser Stresszustand während der Isolation kann nun aber andererseits nicht für die der Erwartung zuwiderlaufende, teilweise eingedellte Form der Protoplasten in Ultradünnschnittpräparaten (Abb. 5) verantwortlich gemacht werden, da in den zum Vergleich angesetzten Gefrierätzproben, bei welchen die mechanischen und osmotischen Beanspruchungen während der Probenaufbereitung ja entfallen, die Protoplastenreplikate prall rund erscheinen (Abb 7 a), was bedeutet, dass die erwähnte Formveränderung präparationsbedingt sein muss.

Ausser dieser sehr allgemeinen Information über die äussere Form der Protoplasten kann die Gefrierätztechnik - je nach Verlauf der Bruchflächen - aber auch Angaben über strukturelle Eigenheiten der Plasmamembran liefern: durch Freilegung eines eingefrorenen Protoplasten wird bei Herausragen des Objekts aus dem Bruch die ES- oder PF-Ansicht, bei Herausbruch des Protoplasten die EF- oder PS-Ansicht (für die Nomenklatur vgl. Branton et al., 1975) exponiert, wobei sich die einzelnen Flächenansichten in der Bestückung mit Partikeln verschiedener Grösse und Anordnung unterscheiden können (Meyer und Winkelmann, 1969). Bei Rebenprotoplasten konnten in einzelnen Fällen, bei denen der Spaltbruch eindeutig innerhalb der Plasmamembran verlief, auf der normalerweise unregelmässig mit kleinen Protuberanzen bespickten PF-Fläche Areale mit streng geometrischer Partikelanordnung gefunden werden. Vergleichbare Strukturen sind

aus frisch angesetzten Protoplastenkulturen in Wandresyntheseexperimenten bekannt und aufgrund ihres meist verzögerten Auftretens mit der einsetzenden de novo-Bildung von cellulosesynthetisierenden Enzymen in Zusammenhang gebracht worden (Robenek und Peveling, 1977; Schnabl et al., 1980). Diese Hypothese wurde dann jedoch von Davey und Mathias (1979) sowie Wilkinson und Northcote (1980) bezweifelt, die das Phänomen auf die Verwendung von Schutzmitteln beim Einfrieren der Proben bzw. eine osmotisch bedingte, extreme Kontraktion der Plasmamembran zurückführten und damit zu einem Präparationsartefakt deklassierten. Die vorgebrachten Einwände können aber bei der hier zur Anwendung gelangten 'nitrogen slush' Aufarbeitungsmethode nicht gelten, da hierbei kein Gefrierschutzmittel eingesetzt wird. Ausserdem konnte der kausale Zusammenhang zwischen dem Auftreten der sog. Membranrosetten und der Cellulosesynthese an Grünalgen- (Giddings et al., 1980) sowie Mais- und Bohnenprotoplasten (Müller und Brown, 1980) eindeutig nachgewiesen werden. Unter diesem Aspekt könnte allenfalls die Beobachtung von Bedeutung sein, dass sich die beiden Hauptachsen des hexagonalen Anordnungsmusters der betreffenden Membranpartikel in auffälliger Übereinstimmung mit den Texturrichtungen in der Sekundärwand des Blattes unter einem Winkel von ca. 60° schneiden (Abb. 7 d und e).

Nachdem aus diesen Ergebnissen hervorgeht, dass sich die isolationsbedingten Veränderungen der Protoplastenstruktur im Vergleich mit dem Ausgangsgewebe in engen Grenzen halten und insbesondere weder die Membranfunktion noch die Struktur der Organellen irgendwie beeinträchtigt sind, wurde im folgenden die Repräsentativität der Isolate in Bezug auf das Stoffwechsellmuster untersucht. Entsprechende Vergleiche mit den metabolischen Produkten von intaktem Gewebe hatten bei anderen Objekten in dieser Hinsicht verschiedentlich Abweichungen zutage gebracht, die entweder auf die Wirkung der Cellulasebehandlung selbst (Patnaik et al., 1981; Morris et al., 1981) oder dann auf die osmotischen Bedingungen während der Isolation zurückzuführen sein dürften (Colman und Mawson, 1978; Ruesink, 1978; Kaiser et al., 1981; Morris et al., 1981). Qualitative Analysen der Fraktion der organischen Säuren lassen aber erkennen, dass im vorliegenden Fall die Zusammensetzung dieser Substanzgruppe, die im allgemeinen auf Wechsel der Umweltbedingungen recht empfindlich reagiert (Malipiero et al., 1981), keine Abweichungen gegenüber dem Ausgangsmaterial zeigt. In Bezug auf den Malatstoffwechsel, der insbesondere auf veränderte Lichtverhältnisse anspricht (Ruffner, 1973; Boecher und Kluge, 1978), wären allerdings quantitative Aussagen notwendig. Ein genauer Vergleich mit dem Ausgangsmaterial wird aber durch die Schwierigkeit verunmöglicht, eine verlässliche Bezugsgrösse zu finden. Insbesondere musste die Bestimmung des Chlorophylls als

Vergleichsparameter fallengelassen werden, da die im Ausgangsmaterial auftretenden, deutlichen Unterschiede im Pigmentgehalt in den entsprechenden Protoplastensuspensionen nicht gefunden werden konnten, was fallweise auf eine gewisse Selektion bestimmter Zellgruppen innerhalb des Mesophylls als Protoplastenpräkursoren schliessen lässt. Im Falle des Malatgehalts konnte eine, wenn auch lose, Beziehung zwischen der Aepfelsäurekonzentration von Blättern und derjenigen von Protoplasten nachgewiesen werden (Abb. 9a und 10). Im Gegensatz zu den oben erwähnten Parametern stellt die Individuenzahl in den Protoplastensuspensionen hingegen eine weitgehend stabile Bezugsgrösse dar (Tab. 1).

3. Physiologische Aspekte

Die Protoplastenisolate entsprechen demnach, wie in den vorangehenden Abschnitten dargelegt, den gestellten Anforderungen sowohl von der Individuenzahl und der damit garantierten Repräsentanz als auch von ihren Ueberlebenschancen und Eigenschaften her. Damit steht einer Verwendung dieses Experimentalsystems zur Untersuchung von stoffwechselphysiologischen Aktivitäten nichts mehr im Wege, wobei, wie ebenfalls erwähnt, primär die Bilanz des Aepfelsäuregehalts als Resultat von auf- und abbauenden Reaktionen bzw. deren Veränderung in Abhängigkeit von pH, Licht und ernährungsphysiologischen Faktoren erfasst wird.

Wie zu erwarten war, sank der Säuregehalt im Dunkeln auf einen tieferen Wert als im Licht (Tab. 4). Da das Inkubationsmedium den Protoplasten keine C-Quelle bietet, muss man annehmen, dass Malat zur Aufrechterhaltung von Lebensfunktionen veratmet oder umgebaut wird. Der höhere Säurewert nach Inkubation im Licht kann damit auf eine gleichzeitig mit dem Abbau verlaufende Neusynthese zurückgeführt werden, was sich in einzelnen Versuchen durch Säureendkonzentrationen äusserte, die über dem Anfangspegel lagen (Abb. 10 und 13). Es ist aber nicht klar, ob die Abbaurate im Hellen derjenigen im Dunkeln entspricht. Die Bilanz der malatsynthetisierenden und -abbauenden Stoffwechselwege hängt jedoch nicht nur von den Lichtverhältnissen, sondern ebenso sehr vom pH-Wert des Inkubationsmediums ab, wobei in Analogie zu den Resultaten von Versuchen mit Spinatstreifchen (Böcher und Kluge, 1977 und 1978) die Säurebilanz pH-abhängig war (Abb. 11). Der Verdacht, dass die im pH-Gradienten durch das Mischungsverhältnis der Puffersalze in verschiedenen Mengen vorliegenden Ionen direkt den Stoffwechsel beeinflusst haben könnten, wurde durch Verwendung eines mineralionenfreien Puffers bzw. von Phosphatpuffer, der ausschliesslich mit NaOH oder KOH eingestellt worden war, entkräftet (Abb. 12 und 13). Auch die Verwendung von Zwitterionenpuffersystemen ergab das gleiche Bild, womit

die Hypothese an Wahrscheinlichkeit gewinnt, dass das gelöste CO_2 nur in der ionalen Form in den Malatstoffwechsel einbezogen wird. Auffallend ist in diesem Zusammenhang, dass ein rapider Anstieg der Aepfelsäure in demjenigen Bereich stattfindet, in welchem sich das Verhältnis $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ zugunsten von HCO_3^- verschiebt, was für eine geschwindigkeitsbestimmende Umsatzrate der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (HCO_3^- -spezifisch: Cooper und Wood, 1971; Coombs et al., 1975) unter diesen Umständen spricht. Wie aus Abb. 15 hervorgeht, kann ein Zusatz von Bikarbonat tatsächlich nur bei pH 6 und 6,5 eine Steigerung der Malatsynthese bewirken. Bei pH 7 bis 8 ist offensichtlich nicht mehr die ohnehin höhere Bikarbonatkonzentration, sondern wahrscheinlich das aus dem Calvin-Zyklus stammende Akzeptormolekül für die Malatbildung limitierend (Abb. 15). Fehlende Stimulation der Photosynthese durch Bikarbonatgabe bei höheren pH-Werten steht ferner mit der Tatsache in Einklang, dass die durch Ribulosediphosphat-Carboxylase katalysierte Reaktion CO_2 , und nicht HCO_3^- , involviert (Cooper et al., 1969).

Was die Photosynthesekapazität der isolierten Protoplasten betrifft, so liegt der gemessene Einbau in der Größenordnung von $20 \mu\text{mol CO}_2/\text{mg Chl. Std.}$ und ist somit mit derjenigen von ganzen Blättern (Malipiero et al., 1981) sowie Blattscheibchen (Brem et al., 1981), die $4 - 30 \mu\text{mol CO}_2/\text{mg Chl. Std.}$ inkorporieren und auch von Mesophyllzellen von Nicotiana, Antirrhinum (Morris et al., 1981; Aidid und Thain, 1980) und Glycine (Servaites und Ogren, 1977) durchaus vergleichbar. Erwartungsgemäss beeinflussten ausser den pH-Verhältnissen während der Applikation von NaHCO_3 (s. oben) auch die Beleuchtungsbedingungen die ^{14}C -Assimilation und zwar nicht nur quantitativ (Tab. 7), sondern auch qualitativ. Wie aus Abb. 15 und Tab. 8 hervorgeht, wirkte sich eine Inkubation im Licht in einer deutlichen Bevorzugung der Zuckersynthese aus, während sinkende pH-Werte vor allem eine verstärkte Inkorporation von radioaktivem Kohlenstoff in die Aminosäurefraktion zur Folge hatte. Anhand eines Vergleichs der in Abb. 15 dargestellten Resultate mit dem Verteilungsmuster der markierten Photosyntheseprodukte nach Angebot von $^{14}\text{CO}_2$ an Rebenblätter (Malipiero et al., 1981) entsprechen die Werte des beleuchteten Ansatzes bei pH 7,5 wohl am ehesten den Verhältnissen im intakten Blatt. Der einzige augenfällige Unterschied besteht im Fehlen von Radioaktivität in der Fraktion der phosphorylierten Zucker; er dürfte der langen Inkubationszeit zuzuschreiben sein. Einen weiteren Faktor, der neben Licht und pH den Stoffwechsel zu beeinflussen vermag, stellt die qualitative Zusammensetzung der gelösten Gase im Inkubationsmedium dar. So bewirkte Anreicherung der Protoplastensuspensionen mit Sauerstoff im Vergleich zu unbehandelten oder mit Luft durchgasten Proben eine

deutliche Verminderung des ^{14}C -Einbaus, während N_2 eine Erhöhung nach sich zog (Tab. 9), was in Übereinstimmung steht mit den Resultaten aus Versuchen an ganzen Blättern (Malipiero et al., 1981) bzw. Messungen an Blattprotoplasten von Spinat (Nishimura et al., 1975).

Da der C_3 -Körper für den Carboxylierungsschritt zu Oxalacetat und letztlich Malat aller Wahrscheinlichkeit nach einem aus der Photosynthese direkt gespeisten intermediären Hexosepool entstammt, wurde den Protoplasten auch Glucose als C-Quelle angeboten, allerdings mit negativem Resultat. Dies ist wohl auf eine erschwerte Passage des Zuckers durch die Plasmamembran zurückzuführen und steht in Übereinstimmung mit analogen Beobachtungen an Protoplasten von Erbsenblättern (Guy et al., 1978, 1980 und 1981). Andererseits ergeben sich bei Fütterung von Pericarpsegmenten (Brown und Coombe, 1982), Exocarpstücken (Coombe und Matile, 1980) sowie Protoplasten von Weintrauben (Brown, 1981) mit Glucose keine wesentlichen Schwierigkeiten bei der Aufnahme, was leicht dadurch erklärt werden kann, dass Zellen dieser Provenienz in situ Glucose - durch Invertasewirkung aus in die Frucht importierter Saccharose entstehend (Hawker, 1969) - aufnehmen, während die bezüglich des Zuckermetabolismus autonomen Blattzellen ein entsprechendes Transportsystem nicht benötigen und demzufolge offensichtlich auch nicht synthetisieren.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die vorliegende Arbeit präsentiert eine Methode, die gestattet, aus Blättern von *Vitis vinifera* Protoplasten in hoher Ausbeute und Reinheit zu gewinnen. Die Isolationstechnik beinhaltet einen enzymatischen Abbau der Zellwand durch Cellulase 'Onozuka R-10' und eine Reinigung des Isolates durch Zentrifugation in einem Stufengradienten.
2. An Protoplastensuspensionen durchgeführte zellphysiologische Tests belegen die volle Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit von Plasmalemma und Tonoplast.
3. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Protoplasten und solche von Zellen des Ausgangsgewebes lassen keine wesentlichen Unterschiede erkennen. Dies gilt insbesondere auch für die Anzahl, Anordnung und Struktur der besonders empfindlichen Zellorganellen.
4. Mittels Gefrierätzung wurde das vollständige Fehlen von Wandresten und damit der Erfolg des Isolationsvorgangs eindeutig nachgewiesen. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von hexagonalen Strukturen im Plasmalemma und der Aktivität eines Wandresyntheseenzym wird diskutiert.
5. Die qualitative gaschromatographische Analyse der Fraktion der nichtflüchtigen organischen Säuren und die quantitative Bestimmung der Aepfelsäure von Protoplasten zeigen, dass diese auch diesbezüglich für die Zellen im intakten Blatt repräsentativ sind.
6. Bei Angebot von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ assimilieren Protoplasten radioaktiven Kohlenstoff, wobei aufgrund der Licht-, pH- und Bikarbonat-Abhängigkeit eine Fixierung sowohl über den Calvin-Zyklus als auch via β -Carboxylierung erfolgt - wie im Blatt. Die spezifischen Anforderungen der entsprechenden Schlüsselenzyme erklären die auftretenden Veränderungen der Aepfelsäurekonzentration voll auf.

D A N K

An dieser Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. D.M. Rast für ihr stetes Interesse am Fortschreiten der Arbeit, für ihre Ideenbeiträge sowie für ihren Einsatz bei der Bereinigung des Manuskripts meinen Dank aussprechen.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. H.P. Ruffner für die vielseitigen Ratschläge bei der Durchführung und Auswertung der Versuche, das Erstellen der Computerprogramme und für die willkommenen, wertvollen Anregungen bei der Abfassung des Manuskripts.

Ferner danke ich auch Herrn Dr. W. Egger für seine Unterstützung bei histologischen und photographischen Arbeiten sowie Herrn Dr. L. Nyhlén für seine Ideen zur Interpretation der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Zur Realisierung dieser Arbeit hat auch die Eidgenössische Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil beigetragen, die in verdankenswerter Weise die Stecklinge zur Anzucht der Versuchspflanzen zur Verfügung gestellt hat.

V I . L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Arnon, D.I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol-oxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24, 1-15 (1949)
- Aidid, S.B. and Thain, J.F.: Comparative studies of leaf tissue and isolated mesophyll cells of Antirrhinum majus L. I. O_2 exchange and CO_2 fixation. J. Exp. Bot. 31, 1035-1042 (1980)
- Bailey, J.L. and Whyborn, A.G.: The osmophilic globules of chloroplasts. II. Globules of the spinach-beet chloroplast. Biochim. Biophys. Acta 78, 163-174 (1963)
- Bajaj, Y.P.S.: Protoplast isolation, culture and somatic hybridization. In: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture (J. Reinert, Y.P.S. Bajaj, eds.), pp. 467-496. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag 1977
- Bajaj, Y.P.S. and Davey, M.R.: The isolation and ultrastructure of pollen protoplasts. In: Fertilization in Higher Plants (H.F. Linskens, ed.), pp. 73-80. Amsterdam: North Holland 1974
- Baumann, G. and Günther, G.: Metabolism of (U- ^{14}C)-serine in leaf discs and isolated mesophyll cells from Chenopodium album. Biochem. Physiol. Pflanz. 175, 745-754 (1980)
- Baur, P.S. and Walkinshaw, C.H.: Fine structure of tannin accumulations in callus cultures of Pinus eliottii (slash pine). Can. J. Bot. 52, 615-619 (1974)
- Böcher, M. und Kluge, M.: Der C_4 -Weg der C-Fixierung bei Spinacea oleracea. I. ^{14}C -Markierungsmuster suspendierter Blattstreifen unter dem Einfluss des Suspensionsmediums. Z. Pflanzenphysiol. 83, 347-361 (1977)
- Böcher, M. und Kluge, M.: Der C_4 -Weg der C-Fixierung bei Spinacea oleracea. II. Pulse-chase Experimente mit suspendierten Blattstreifen. Z. Pflanzenphysiol. 86, 405-421 (1978)
- Boss, W.F. and Ruesink, A.W.: Isolation and characterization of Concanavalin A-labeled plasma membranes of carrot protoplasts. Plant. Physiol. 64, 1005-1011 (1979)
- Branton, D., Bullivant, S., Gilula, N.B., Karnovsky, M.J., Moor, H., Mühlenthaler, K., Northcote, D.H., Packer, L., Satir, B., Satir, P., Speth, V., Stählin, L.A., Steere, R.L. and Weinstein, R.S.: Freeze-etching nomenclature. Science 190, 54-46 (1975)
- Braune, W., Leman, A. und Taubert, H.: Pflanzenanatomisches Praktikum. Jena: Verlag Gustav Fischer 1967

- Brem, S., Ruffner, H.P. and Rast, D.M.: Aspects of malate formation in grape leaves. In: Photosynthesis VI. Photosynthesis and Productivity, Photosynthesis and Environment (G. Akoyunoglou, ed.), pp. 181-188. Philadelphia: Balaban International Science Services 1981
- Briskin, D.P. and Leonard, R.T.: Ion transport in isolated protoplasts from tobacco suspension cells. III. Membrane potential. *Plant Physiol.* 64, 959-962 (1979)
- Brown, S.C.: Sugar accumulation in the developing grape berry. Ph. D. Thesis, University of Adelaide, 1981
- Brown, S.C. and Coombe, B.G.: Sugar transport by an enzyme complex at the tonoplast of grape pericarp cells? *Naturwissenschaften* 69, 43-45 (1982)
- Buser, Ch. and Matile, Ph.: Malic acid in vacuoles isolated from *Bryophyllum* leaf cells. *Z. Pflanzenphysiol.* 82, 462-466 (1977)
- Burgess, J. and Fleming, E.N.: Ultrastructural studies of the aggregation and fusion of plant protoplasts. *Planta* 118, 183-193 (1974)
- Burgess, J. and Linstead, P.J.: Ultrastructural studies of the binding of Concanavalin A to the plasmalemma of higher plant protoplasts. *Planta* 130, 73-79 (1976a)
- Burgess, J. and Linstead, P.J.: Scanning electron microscopy of cell wall formation around isolated plant protoplasts. *Planta* 131, 173-178 (1976b)
- Burgess, J. and Linstead, P.J.: Membrane mobility and the Concanavalin A binding system of the plasmalemma of higher plant protoplasts. *Planta* 136, 253-259 (1977)
- Burgess, J., Linstead, P.J. and Bonsall, V.E.: Observations on the time course of wall development at the surface of isolated protoplasts. *Planta* 139, 85-91 (1978)
- Burgess, J., Watts, J.W., Fleming, E.N. and King, J.M.: Plasmalemma fine structure in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 110, 291-301 (1973)
- Canvin, D.T. and Beevers, H.: Sucrose synthesis from acetate in the germinating castor bean. *J. Biol. Chem.* 236, 988-995 (1961)
- Cassels, A.C. and Barlass, M.: Environmentally induced changes in the cell walls of tomato leaves in relation to cell and protoplast release. *Physiol. Plant.* 73, 239-246 (1976)
- Chellappan, K.P., Seeni, S. and Gnanam, A.: Photosynthetic studies with mesophyll protoplasts from *Notonia grandiflora*, a crassulacean acid metabolism plant. *Physiol. Plant.* 48, 403-410 (1980)
- Cocking, E.C.: A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187, 962-963 (1960)

- Cocking, E.C.: Action of growth substances, chelating agents and antibiotics on isolated root protoplasts. *Nature* 193, 998-999 (1962)
- Cocking, E.C.: Plant cell protoplasts - isolation and development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23, 29-50 (1972)
- Cocking, E.C. and Pojnar, E.: An electron microscopic study of the infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 4, 305-312 (1969)
- Colman, B. and Mawson, B.T.: The role of plasmolysis in the isolation of photosynthetically active leaf mesophyll cells. *Z. Pflanzenphysiol.* 86, 331-338 (1978)
- Coombe, B.G. and Matile, Ph.: Solute accumulation by grape pericarp cells. I. Sugar uptake by skin segments. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 175, 369-381 (1980)
- Coombs, J., Maw, S.L. and Baldry, C.W.: Metabolic regulation in C_4 photosynthesis: The inorganic carbon substrate for PEP carboxylase. *Plant Sci. Lett.* 4, 97-102 (1975)
- Cooper, T.G., Filmer, D., Wishnick, M. and Lane, M.D.: The active species of " CO_2 " utilized by ribulose diphosphate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 244, 1081-1083 (1969)
- Cooper, T.G. and Wood, H.G.: The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. II. The active species of " CO_2 " utilized by phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 246, 5488-5490 (1971)
- Davey, M.R. and Mathias, R.J.: Close-packing of plasma membrane particles during wall regeneration by isolated higher plant protoplasts - fact or artefact? *Protoplasma* 100, 85-99 (1979)
- Davey, M.R., Pearce, N. and Cocking, E.C.: Fusion of legume root nodule protoplasts with non-legume protoplasts: Ultrastructural evidence for the functional activity of *Rhizobium* bacteroids in a heterokaryotic cytoplasm. *Z. Pflanzenphysiol.* 99, 435-447 (1980)
- Downton, W.J.S.: Photosynthesis in salt stressed grapevines. *Aust. J. Plant Physiol.* 4, 183-192 (1977)
- Dürr, M., Boller, T. and Wiemken, A.: Polybase induced lysis of yeast spheroplasts. A new gentle method for preparation of vacuoles. *Arch. Microbiol.* 105, 319-327 (1975)
- Edgington, L.V., Corden, M.E. and Diamond, A.E.: The role of pectic substances in chemically induced resistance to *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology* 51, 179-182 (1961)

- Edwards, G.E., Robinson, S.P., Tyler, N.J.C. and Walker, D.A.: Photosynthesis by isolated protoplasts, protoplast extracts, and chloroplasts of wheat. Influence of orthophosphate, pyrophosphate, and adenylate. *Plant Physiol.* 62, 313-319 (1978)
- Feige, B., Gimmiller, H., Jeschke, W.D. und Simonis, W.: Eine Methode zur dünn-schichtchromatischen Auftrennung von ^{14}C - und ^{32}P -markierten Stoffwechselprodukten. *J. Chromatogr.* 41, 80-90 (1969)
- Fowke, L.C., Bech-Hansen, C.W. and Gamborg, O.L.: Electron microscopic observations of cell regeneration from cultured protoplasts of *Ammi visnaga*. *Protoplasma* 79, 235-248 (1974)
- Frey-Wyssling, A.: Gymnoplasts instead of "protoplasts". *Nature* 216, 516 (1967)
- Galun, E.: Plant protoplasts as physiological tools. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32, 237-266 (1981)
- Giddings, T.H.Jr., Brower, D.L. and Stähelin, L.A.: Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls. *J. Cell Biol.* 84, 327-339 (1980)
- Giersch, C., Heber, U., Kaiser, G., Walker, D.A. and Robinson, S.P.: Intracellular metabolite gradients and flow of carbon during photosynthesis of leaf protoplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 205, 246-259 (1980)
- Gigot, C., Schmitt, C. and Hirth, L.: Modifications ultrastructurales observées au cours de la préparation de protoplastes à partir de cultures de tissus de tabac (*Nicotiana glutinosa* L.). *J. Ultrastruct. Res.* 41, 418-432 (1972)
- Gigot, C., Kopp, M., Schmitt, C. and Milne, R.G.: Subcellular changes during isolation and culture of tobacco mesophyll protoplasts. *Protoplasma* 84, 31-41 (1975)
- Goldstein, J.L. and Swain, T.: The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* 4, 185-192 (1965)
- Grambow, H.J., Kao, K.N., Miller, R.A. and Gamborg, O.L.: Cell division and plant development from plant protoplasts of carrot suspension cultures. *Planta* 103, 348-355 (1972)
- Greenwood, A.D., Leech, R.M. and Williams, J.P.: The osmiophilic globules of chloroplasts. I. Osmiophilic globules as a normal component of chloroplasts and their isolation and composition in *Vicia faba* L. *Biochim. Biophys. Acta* 78, 148-162 (1963)

- Gutierrez, M., Kanai, R., Huber, S.C., Ku, S.B. and Edwards, G.E.: Photosynthesis in mesophyll protoplasts and bundle sheath cells of various types of C_4 plants. I. Carboxylases and CO_2 fixation studies. *Z. Pflanzenphysiol.* 72, 305-319 (1974)
- Gutmann, I. and Wahlefeld, A.W.: L(-)malate determination with malate dehydrogenase and NAD. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (H.U. Bergmeyer, ed.), pp. 1585-1589. Weinheim: Verlag Chemie, Engl. transl., New York-London: Academic Press 1974
- Guy, M., Reinhold, L. and Laties, G.G.: Membrane transport of sugars and amino acids in isolated protoplasts. *Plant Physiol.* 61, 593-596 (1978)
- Guy, M., Reinhold, L. and Rahat, M.: Energization of the sugar transport mechanism in the plasmalemma of isolated mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.* 65, 550-553 (1980)
- Guy, M., Reinhold, L., Rahat, M. and Seiden, A.: Protonation and light synergistically convert plasmalemma sugar carrier system in mesophyll protoplasts to its fully activated form. *Plant Physiol.* 67, 1146-1150 (1981)
- Hall, J.A. and Wood, R.K.S.: Plant cells killed by soft rot parasites. *Nature* 227, 1266-1267 (1970)
- Hardy, P.J.: Metabolism of sugars and organic acids in immature grape berries. *Plant Physiol.* 43, 224-228 (1968)
- Hasler, M.: Isolation von Protoplasten aus *Vitis vinifera* als Ausgangsmaterial für Stoffwechseluntersuchungen. Diplomarbeit, Universität Zürich, 1978
- Hasler, M., Ruffner, H.P. and Rast, D.M.: High-yield isolation of grape leaf protoplasts as an instrument in physiological research. *Experimentia* 38, 564-565 (1982)
- Hawker, J.S.: Insoluble invertase from grapes: an artifact of extraction. *Phytochemistry* 8, 337-344 (1969)
- Heck, U., Martinoia, E. and Matile, Ph.: Subcellular localization of acid proteinase in barley mesophyll protoplasts. *Planta* 151, 198-200 (1981)
- Herth, W. and Meyer, Y.: Ultrastructural and chemical analysis of the wall fibrils synthesized by tobacco mesophyll protoplasts. *Biol. Cell.* 30, 33-40 (1977)
- Horine, R.K. and Ruesink, A.W.: Cell wall regeneration around protoplasts isolated from *Convolvulus* tissue culture. *Plant Physiol.* 50, 438-445 (1972)
- Hrazdina, G., Wagner, G.J. and Siegelman, H.W.: Subcellular localization of enzymes of anthocyanin biosynthesis in protoplasts. *Phytochemistry* 17, 53-56 (1978)

- Huber, S.C. and Edwards, G.E.: C_4 photosynthesis: Light dependent CO_2 fixation by mesophyll cells, protoplasts, and protoplast extracts of Digitaria sanguinalis. Plant Physiol. 55, 835-844 (1975)
- Huber, S.C. and Moreland, D.E.: Translocation. Efflux of sugars across the plasmalemma of mesophyll protoplasts. Plant Physiol. 65, 560-562 (1980)
- Huber, S.C. and Moreland, D.E.: Co-transport of potassium and sugars across the plasmalemma of mesophyll protoplasts. Plant Physiol. 67, 163-169 (1981)
- Kaiser, W.M., Stepper, W. and Urbach, W.: Photosynthesis of isolated chloroplasts and protoplasts under osmotic stress. Reversible swelling of chloroplasts by hypotonic treatment and its effect on photosynthesis. Planta 151, 375-380 (1981)
- Kajita, S., Matsui, C., Syono, K., Suzuki, M. and Nagata, T.: Fine structure of fusion bodies formed between pea root nodule and tobacco mesophyll protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 97, 233-240 (1980)
- Kanai, R. and Edwards, G.E.: Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. Plant Physiol. 51, 1133-1137 (1973a)
- Kanai, R. and Edwards, G.E.: Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C_3 , C_4 , and crassulacean acid metabolism plants using an aqueous dextran-polyethylene glycol two-phase system. Plant Physiol. 52, 484-490 (1973b)
- Kennedy, R.A. and Williams, L.E.: Effect of different killing techniques on early labeled photosynthetic products in C_4 plants. Plant Physiol. 59, 207-210 (1977)
- Kent, S.S.: Photosynthesis in the higher plant Vicia faba. V. Role of malate as a precursor of the tricarboxylic acid cycle. Plant Physiol. 64, 159-161 (1979)
- Kent, S.S., Pinkerton, F.D. and Strobel, G.A.: Photosynthesis in the higher plant Vicia faba. III. Serine, a precursor of the tricarboxylic acid cycle. Plant Physiol. 53, 491-495 (1974)
- Kinnersley, A.M., Racusen, R.H. and Galston, A.W.: A comparison of regenerated cell walls in tobacco and cereal protoplasts. Planta 139, 155-158 (1978)
- Klercker, J.: Eine Methode zur Isolierung lebender Protoplasten. Ofvers. Nertensk. Akad. Forh. Stockholm 49, 463-475 (1892)
- Ku, S.B., Gutierrez, M., Kanai, R. and Edwards, G.E.: Photosynthesis in mesophyll protoplasts and bundle sheath cells of various types of C_4 plants. II. Chlorophyll and Hill reaction studies. Z. Pflanzenphysiol. 72, 320-337 (1974)

- Lakso, A.N. and Kliewer, W.M.: Physical properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme in grape berries. *Am. J. Enol. Viticult.* 26, 75-78 (1975)
- Lakso, A.N. and Kliewer, W.M.: The influence of temperature on malic acid metabolism in grape berries. II. Temperature responses of net dark CO₂ fixation and malic acid pools. *Am. J. Enol. Viticult.* 29, 145-149 (1978)
- Larkin, P.J.: Purification and viability determinations of plant protoplasts. *Planta* 128, 213-216 (1976)
- Loomis, W.D.: Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 31 (S.P. Colowick, N.O. Kaplan, eds.), pp. 528-544. New York-San Francisco-London: Academic Press 1974
- Lörz, H., Harms, C.T. and Potrykus, I.: Isolation of "vacuoplasts" from protoplasts of higher plants. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 169, 617-620 (1976)
- Malipiero, U., Ruffner, H.P. and Rast, D.M.: Photorespiration and malate formation in grape leaves. *Z. Pflanzenphysiol.* 104, 243-251 (1981)
- Matile, Ph.: Biochemistry and function of vacuoles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 193-213 (1978)
- Mettler, I.J. and Leonard, R.T.: Isolation and partial characterization of vacuoles from tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* 64, 1114-1120 (1979)
- Meyer, H.W. und Winkelmann, H.: Die Gefrierätzung und die Struktur biologischer Membranen. *Protoplasma* 68, 253-270 (1969)
- Milosavljević, M. und Nikolić, D.: Photosynthese, Aminosäuregehalt und Feinstruktur des Blattparenchyms bei der Weinrebe. *Vitis* 12, 306-315 (1974)
- Mishra, A.K. and Colvin, J.R.: The formation of wall-like envelopes by isolated tomato-fruit protoplasts. *Protoplasma* 67, 295-305 (1969)
- Moor, H. and Mühlethaler, K.: Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.* 17, 609-668 (1963)
- Morris, P. and Thain, J.F.: Comparative studies of leaf tissue and isolated mesophyll protoplasts. I. O₂ exchange and CO₂ fixation. *J. Exp. Bot.* 31, 83-95 (1980a)
- Morris, P. and Thain, J.F.: Comparative studies of leaf tissue and isolated mesophyll protoplasts. II. Ion relations. *J. Exp. Bot.* 31, 97-104 (1980b)
- Morris, P., Linstead, P. and Thain, J.F.: Comparative studies of leaf tissue and isolated protoplasts. III. Effects of wall-degrading enzymes and osmotic stress. *J. Exp. Bot.* 32, 801-811 (1981)
- Müller, S.C. and Brown, R.M.Jr.: Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *J. Cell Biol.* 84, 315-326 (1980)

- Müller, W.C. and Greenwood, A.D.: The ultrastructure of phenolic-storing cells fixed with caffeine. *J. Exp. Bot.* 29, 757-764 (1978)
- Nagata, T. and Tâkebe, I.: Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 92, 301-308 (1970)
- Nishimura, M., Graham, D. and Akazawa, T.: Effect of oxygen on photosynthesis by spinach leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 56, 718-722 (1975)
- Ohyama, K., Gamborg, O.L. and Miller, R.A.: Isolation and properties of deoxyribonucleic acid from protoplasts of cell suspension cultures of Ammi visnaga and carrot (Daucus carota). *Plant Physiol.* 50, 319-321 (1972)
- Ohyama, K., Pelcher, L.E. and Horn, D.: A rapid simple method for nuclei isolation from plant protoplasts. *Plant Physiol.* 60, 179-181 (1977)
- Paszkowski, J., Lörz, H., Potrykus, I. and Dierks-Ventling, C.: Amino acid uptake and protein synthesis in cultured cells and protoplasts of Zea mays L. *Z. Pflanzenphysiol.* 99, 251-259 (1980)
- Patnaik, G., Wilson, D. and Cocking, E.C.: Importance of enzyme purification for increased plating efficiency and plant regeneration from single protoplasts of Petunia parodii. *Z. Pflanzenphysiol.* 102, 199-205 (1981)
- Pojnar, E., Willison, J.H.M. and Cocking, E.C.: Cell-wall regeneration by isolated tomato-fruit protoplasts. *Protoplasma* 64, 460-480 (1967)
- Possner, D., Ruffner, H.P. and Rast, D.M.: Isolation and biochemical characterization of grape malic enzyme. *Planta* 151, 549-554 (1981)
- Potrykus, I.: Transplantation of chloroplasts into protoplasts of Petunia. *Z. Pflanzenphysiol.* 70, 364-366 (1973)
- Potrykus, I. and Hoffmann, F.: Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 69, 287-289 (1973)
- Prat, R.: Contribution à l'étude des protoplastes végétaux. I. Effet du traitement d'isolement sur la structure cellulaire. *J. Microscopie* 14, 85-114 (1972)
- Raj, B. and Herr, J.M.: Isolation of protoplasts from the placental cells of Lycopersicum pimpinellifolium Mill. *Exp. Cell Res.* 64, 479-481 (1971)
- Rao, I.M., Rajendrudu, G. and Das, V.S.R.: Isolation of photosynthetically active mesophyll cells and protoplasts from leaves of C_3 , C_4 and CAM plants. *Curr. Sci. India* 49, 389-390 (1980)
- Rathnam, C.K.M. and Chollet, R.: Photosynthetic and photorespiratory carbon metabolism in mesophyll protoplasts and chloroplasts isolated from isogenic diploid and tetraploid cultivars of ryegrass (Lolium perenne L.). *Plant Physiol.* 65, 489-494 (1980)

- Robenek, H. und Peveling, E.: Veränderungen des Plasmalemmas während der Zellwandregeneration an isolierten Protoplasten aus dem Sprosskallus von Skimmia japonica Thunb. Planta 127, 281-284 (1975)
- Robenek, H. und Peveling, E.: Ultrastructure of the cell wall regeneration of isolated protoplasts of Skimmia japonica Thunb. Planta 136, 135-145 (1977)
- Robinson, D.G. and Schlösser, U.G.: Cell wall regeneration by protoplasts of Chlamydomonas. Planta 141, 83-92 (1978)
- Robinson, S.P. and Walker, D.A.: Rapid separation of the chloroplast and cytoplasmic fractions from intact leaf protoplasts. Arch. Biochem. Biophys. 196, 319-323 (1979)
- Robinson, S.P. and Walker, D.A.: Distribution of metabolites between chloroplast and cytoplasm during the induction phase of photosynthesis in leaf protoplasts. Plant Physiol. 65, 902-905 (1980)
- Robinson, S.P., McNeil, P.H. and Walker, D.A.: Ribulose biphosphate carboxylase - Lack of dark inactivation of the enzyme in experiments with protoplasts. FEBS Lett. 97, 296-300 (1979)
- Rubinstein, B. and Tattar, T.A.: Regulation of amino acid uptake into oat mesophyll cells: A comparison between protoplasts and leaf segments. J. Exp. Bot. 31, 269-279 (1980)
- Ruesink, A.W.: Leucine uptake and incorporation by Convolvulus tissue culture cells and protoplasts under severe osmotic stress. Physiol. Plant 44, 48-56 (1978)
- Ruesink, A.W. and Thimann, K.V.: Protoplasts: Preparation from higher plants. Science 154, 280-281 (1966)
- Ruffner, H.P.: Biogenese und Translokation von Tartrat in der Weinrebe. Dissertation, Universität Zürich, 1973
- Ruffner, H.P.: Metabolism of tartaric and malic acids in Vitis. A review - Part A. Vitis 21, 247-259 (1982)
- Saito, K. and Kasai, Z.: Akkumulation of tartaric acid in the ripening process of grapes. Plant Cell Physiol. 9, 529-537 (1968)
- Saunders, J.A. and Conn, E.E.: Presence of the cyanogenic glucoside dhurrin in isolated vacuoles from Sorghum. Plant Physiol. 61, 154-157 (1978)
- Schenk, R.U. and Hildebrandt, A.C.: Production of protoplasts from plant cells in liquid culture using purified commercial cellulases. Crop. Sci. 9, 629-631 (1969)
- Schmidt, R. and Poole, R.J.: Isolation of protoplasts and vacuoles from storage tissue of red beet. Plant Physiol. 66, 25-28 (1980)
- Schnabl, H.: CO₂ and malate metabolism in starch-containing and starch-lacking guard-cell protoplasts. Planta 149, 52-58 (1980)

- Schnabl, H.: The compartmentation of carboxylating and decarboxylating enzymes in guard cell protoplasts. *Planta* 152, 307-313 (1981)
- Schnabl, H., Vienken, J. and Zimmermann, U.: Regular arrays of intramembranous particles in the plasmalemma of guard cell and mesophyll cell protoplasts of *Vicia faba*. *Planta* 148, 231-237 (1980)
- Schnabl, H., Bornman, C.H. and Ziegler, H.: Studies on isolated starch-containing (*Vicia faba*) and starch-deficient (*Allium cepa*) guard cell protoplasts. *Planta* 143, 33-39 (1978)
- Schürmann, P.: Separation of phosphate esters and algal extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *J. Chromatogr.* 39, 507-509 (1969)
- Senn, A. and Pilet, P.-E.: Isolation and some morphological properties of maize root protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 100, 299-310 (1980)
- Servaites, J.C. and Ogren, W.L.: pH dependence of photosynthesis and photorespiration in soybean leaf cells. *Plant Physiol.* 60, 693-696 (1977)
- Shepard, J.F.: Protoplasts as sources of disease resistance in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19, 145-166 (1981)
- Skene, K.G.M.: Culture of protoplasts from grape vine pericarp callus. *Aust. J. Plant Physiol.* 1, 371-376 (1974)
- Skene, K.G.M.: Production of callus from protoplasts of cultured grape pericarp. *Vitis* 14, 177-180 (1975)
- Skene, K.G.M.: Protoplasts. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Report 1975-1977, p. 128. Division of Horticultural Research, Adelaide, Australia (1977)
- Somerville, C.R., Somerville, S.C. and Ogren, W.L.: Isolation of photosynthetically active protoplasts and chloroplasts from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci. Lett.* 21, 89-96 (1981)
- Spurr, A.R.: A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31-43 (1969)
- Stadelmann, E.J. and Kinzel, H.: Vital staining of plant cells. In: *Methods in Cell Physiology*, Vol. V (D.M. Prescott, ed.), pp. 325-372. New York-London: Academic Press 1972
- van Sumere, C.F., Albrecht, J., Dedonder, A., de Pooter, H. and Pé, I.: Plant proteins and phenolics. In: *The Chemistry and Biochemistry of Plant Proteins* (J.P. Harborne, C.F. van Sumere, eds.), pp. 211-264. London-New York-San Francisco: Academic Press 1975
- Taiz, L. and Jones, R.L.: The isolation of barley aleurone protoplasts. *Planta* 101, 95-100 (1971)

- Tanaka, M.: Binding of alditols to the hydroxyl form of Dowex-1 X8, a strongly basic ion-exchange resin: an improved method for estimation of the degree of polymerization of neutral oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 88, 1-8 (1981)
- Taylor, A.R.D. and Hall, J.L.: Some physiological properties of protoplasts isolated from maize and tobacco tissues. *J. Exp. Bot.* 27, 383-391 (1976)
- Taylor, A.R.D. and Hall, J.L.: Fine structure and cytochemical properties of tobacco leaf protoplasts and comparison with the source tissue. *Protoplasma* 96, 113-126 (1978)
- Vasil, I.K.: The progress, problems, and prospects of plant protoplast research. *Adv. Agron.* 28, 119-160 (1976)
- Volokita, M., Kaplan, A. and Reinhold, L.: Evidence for mediated HCO_3^- transport in isolated pea mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.* 67, 1119-1123 (1981)
- Wagner, G.J. and Siegelman, H.W.: Large-scale isolation of intact vacuoles and isolation of chloroplasts from protoplasts of mature plant tissues. *Science* 190, 1298-1299 (1975)
- Wallin, A., Glimelius, K. and Eriksson, T.: The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol. *Z. Pflanzenphysiol.* 74, 64-80 (1974)
- Weber, G., Constabel, F., Williamson, F., Fowke, L. and Gamborg, O.L.: Effect of preincubation of protoplasts on PEG-induced fusion of plant cells. *Z. Pflanzenphysiol.* 79, 459-464 (1976)
- Wilkinson, M.J. and Northcote, D.H.: Plasma membrane ultrastructure during plant protoplast plasmolysis, isolation and wall regeneration: a freeze-fracture study. *J. Cell Sci.* 42, 401-415 (1980)
- Williamson, F.A.: Concanavalin A binding sites on the plasma membrane of leek stem protoplasts. *Planta* 144, 209-215 (1979)
- Williamson, F.A., Fowke, L.C., Weber, G., Constabel, F. and Gamborg, O.: Microfibril deposition on cultured protoplasts of *Vicia hajastana*. *Protoplasma* 91, 213-219 (1977)
- Willison, J.H.M. and Cocking, E.C.: The production of microfibrils at the surface of isolated tomato-fruit protoplasts. *Protoplasma* 75, 397-403 (1972)
- Willison, J.H.M. and Cocking, E.C.: Microfibril synthesis at the surface of isolated tobacco mesophyll protoplasts, a freeze-etch study. *Protoplasma* 84, 147-159 (1975)
- Wirtz, W., Stitt, M. and Heldt, H.W.: Enzymic determination of metabolites in the subcellular compartments of spinach protoplasts. *Plant Physiol.* 66, 187-193 (1980)

- Withers, L.A. and Cocking, E.C.: Fine-structural studies on spontaneous and induced fusion of higher plant protoplasts. *J. Cell Sci.* 11, 59-75 (1972)
- Wooi, K.C. and Broughton, W.J.: Isolation and metabolism of Vigna unguiculata root nodule protoplasts. *Planta* 145, 487-495 (1979)

C U R R I C U L U M V I T A E

von Marlies Hasler, Bürgerin von Hasle/Burgdorf BE, geboren am 1. Dezember 1953 in Thun

- 1960 - 1965 Primarschule in Hünibach BE und Meisterschwanden AG
1965 - 1969 Bezirksschule in Seengen AG
1969 - 1973 Kantonsschule in Aarau, Abschluss: Maturität Typus B
1973 Immatrikulation an der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich, Studium mit Hauptfach Botanik
1978 Diplom in allgemeiner Botanik
1978 - 1982 Doktorarbeit unter der Leitung von Frau Prof. D.M. Rast am Institut für Pflanzenbiologie. Seit 1977 Assistentin am gleichen Institut

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika bei folgenden Dozenten:

Mathematik: Prof. E.Batschelet

Physik: Prof. E.Brun, Prof. W.Kündig

Chemie: Prof. C.H.Eugster, Prof. H.R.Oswald

Biochemie: Prof. P.Christen, Prof. R.Humbel, Prof. J.Kägi

Physikalische Chemie: Prof. H.Fischer, Prof. G.Wagnière

Molekularbiologie: Prof. M.A.Billeter, Prof. M.Birnstiel, Prof. C.Weissmann

Anthropologie: Prof. J.Biegert

Anatomie und Physiologie des Menschen: Prof. S.Kubik, K.Greeff

Paläontologie: Prof. E.Kuhn-Schnyder

Zoologie: Prof. H.Burla, Prof. P.S.Chen, Prof. H.Kummer, Prof. P.Tardent,
Prof. R.Wehner, Prof. V.Ziswiler, Dr. A.Dübendorfer, Dr. G.Mindek

Systematische Botanik: Prof. C.D.K.Cook

Allgemeine Botanik: Prof. R.Bachofen, Prof. H.R.Hohl, Prof. R.Parish, Prof.
D.M.Rast, Prof. H.Wanner, Dr. T.Baumann, Dr. G.Dütsch,
Dr. R.Honegger, Dr. U.P.Roos, F.Schwegler

Didaktik: Prof. O.Woodtli, Dr. M.Greuter, Dr. R.Staub

